

MORGANA ELI VIANNA

Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Clínica
Odontológica – Área de Endodontia**

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

PIRACICABA

2006

MORGANA ELI VIANNA

Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Clínica
Odontológica – Área de Endodontia**

Banca examinadora:

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes (orientadora)
Profa. Dra. Izabel Cristina Fröner
Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

PIRACICABA

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

V655m Vianna, Morgana Eli.
Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas. / Morgana Eli Vianna. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Clorexidina. 2. Medicação. 3. Antibióticos. 4. Endotoxina.
I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Microbiology and treatment of endodontic infections

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Chlorhexidine. 2. Medication. 3. Antibiotics. 4. Endotoxins

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Izabel Cristina Fröner, Manoel Damião de Sousa Neto, Pedro Luiz Rosalen, Alexandre Augusto Zaia

Data da Defesa: 31-10-2006

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 31 de Outubro de 2006, considerou a candidata MORGANA ELI VIANNA aprovada.

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROFa. DRa. IZABEL CRISTINA FRONER

PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSÁLEN

PROF. DR. MANOEL DAMIÃO DE SOUSA NETO

Biografia

Morgana Eli Vianna, nascida em 11/ 10/ 1970 na cidade de Boituva, SP, Brasil.

- | | |
|-----------------|--|
| 1990-1993 | Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). |
| 1994-1996 | Especilização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). |
| 1997-1998 | Especialização em Saúde Pública
Centro de Estudos “Franco da Rocha, Universidade de Ribeirão Preto – São Paulo (UNAERP). |
| 03/1999–03/2001 | Estágio no Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP). |
| 03/2001-12/2002 | Mestrado em Clínica Odontológica (área Endodontia)
Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP). |
| 03/2003-2006 | Doutorado em Clínica Odontológica (área Endodontia)
Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP). |
| 11/2003-04/2004 | Estágio laboratorial prático em técnica moleculares de identificação e quantificação microbiana. RWTH Aachen – University Hospital Oral Microbiology and Immunology, Alemanha. |
| 02/2005-03/2006 | Estágio de doutoramento na RWTH Aachen – University Hospital Oral Microbiology and Immunology, Alemanha. |

Lista de publicações página

<http://lattes.cnpq.br/2996508458024811>

Dedico este trabalho a ...

...meu esposo, Reginaldo Ferreira, pela ajuda, amor, companheirismo e compreensão.

...minha mãe, Mary Ely Possatti Vianna, pelo amor, exemplo de honestidade e luta.

... todos os meus familiares, em especial minha irmã Mônica, meu cunhado Mário, sobrinhos Mariana e Murilo, tia Neyde e José Paes por todos os momentos já vividos. A meu pai Antonio e meu irmão Marco que já partiram desta vida.

Agradeço ...

A Deus, pois se hoje percorro este caminho é porque vós trilhastes, deste-me sabedoria para aprender a discernir, alegria e entusiasmo para transmitir aos que estiveram ao meu lado, coragem para lutar e força para vencer mais esta etapa em minha vida. Peço sua benção para a nova jornada que se inicia.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pelo exemplo de competência e dedicação profissional. A minha homenagem àquela que dedica sua vida ao ensino, pois dela é o mérito de moldar as vocações e incentivar o raciocínio, transformando nossos ideais em realizações.

Ao Prof. Dr. Georg Conrads, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório de Microbiologia Oral no Hospital Universitário RWTH Aachen e contribuir muito em minha formação.

Ao Dr. Hans-Peter Horz do Hospital Universitário RWTH Aachen por ter dividido seu tempo comigo, ajudando nas tarefas diárias e transferindo seus conhecimentos.

À Sra. Ilse Seyfarth Hospital Universitário RWTH Aachen pela sua ajuda no laboratório, que com sua alegria fazia com que o trabalho se tornasse uma diversão.

Aos órgãos de Fomento: FAPESP, CAPES e ALBAN pelo apoio financeiro durante meu período de formação.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, instituição onde me graduei e me especializei, a qual sempre levarei em minhas memórias, agradeço aos professores, funcionários e amigos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, de quem recebi apoio necessário para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, coordenador geral do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Jr., coordenador suplente do curso pós-graduação de Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Às secretárias da pós-graduação: Érica A. Pinho Sinhoreti, Raquel Q.M.C. Sacchi e a estagiária Tatiane C. Gava.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, chefe Do Departamento de Odontologia Resturadora da FOP/UNICAMP, pelo exemplo de competência.

Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo de competência.

Aos Professores Doutores da área de Endodontia da FOP: Alexandre Augusto Zaia, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gome, Caio Cezar Randi Ferraz, Francisco José de Souza-Filho e Luis Valdrighi, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.

Ao Prof. Robson Marcelo Rossi, da Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Estatística, pelo auxílio na realização dos testes estatísticos e ensinamentos na área.

Aos Professores Doutores Alexandre Augusto Zaia, Carlos Henrique Gomes Martins e Eduardo Dias de Andrade, os quais participaram da banca examinadora em meu exame de Qualificação, contribuindo com as correções deste trabalho.

Aos meus estimados amigos, alunos e ex-alunos do curso de Mestrado e Doutorado em Clínica Odontológica, pela amizade e companheirismo.

A todos alunos e ex-alunos de iniciação científica e estagiários e ex-estagiários da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, em especial ao Adailton do Santos Lima, pela convivência e auxílio em meus trabalhos diários.

À GS Brasil pelo apoio na realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	RESUMO	1
	ABSTRACT	3
1.	INTRODUÇÃO	5
2.	REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1.	MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES	9
2.1.1.	MICROBIOTA ORAL E DO CANAL RADICULAR	9
2.1.2.	OS CANAIS RADICULARES SÃO NICHOS ÚNICOS DE INFECÇÃO	10
2.1.3.	NUTRIÇÃO COMO UM GUIA ECOLÓGICO	13
2.1.4.	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	17
2.1.4.1.	MÉTODO DA CULTURA DE MICRORGANISMOS	17
2.1.4.2.	MÉTODOS MOLECULARES	20
2.1.4.3.	MÉTODOS DE CULTURA ASSOCIADOS A MÉTODOS MOLECULARES	25
2.1.5.	ARCHAEA NOS CANAIS RADICULARES	26
2.1.6.	ENDOTOXINAS	27
2.1.6.1.	PARCIPAÇÃO DAS ENDOTOXINAS NA RESPOSTA IMUNE	29
2.2.	MEDICAMENTOS DE USO LOCAL E SISTÊMICOS NO COMBATE À INFECÇÃO ENDODÔNTICA	37
2.2.1.	MEDICAMENTOS DE USO LOCAL EM ENDODONTIA	37
2.2.1.1.	SUBSTÂNCIAS AUXILIARES DO PREPARO QUÍMICO MECÂNICO	37

2.2.1.1.1.	ESTUDOS DE REDUÇÃO MICROBIANA IN VITRO	40
2.2.1.1.2.	ESTUDOS DE REDUÇÃO MICROBIANA IN VIVO	44
2.2.1.2.	MEDICAMENTOS INTRACANAIS	48
2.2.1.2.1.	HIDRÓXIDO DE CÁLCIO	49
2.2.1.2.2.	CLOREXIDINA (UTILIZADA COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL)	58
2.2.1.2.3.	HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO A CLOREXIDINA	60
2.2.2.	MEDICAMENTOS DE USO SISTÊMICO EM ENDODONTIA	65
2.2.2.1.	β-LACTÂMICOS	67
2.2.2.2.	LICOSAMINAS	69
2.2.2.3.	MACROLÍDEOS	70
2.2.2.4.	NITROIMIDAZÓLICOS	70
2.2.2.5.	USO DE ANTIBIÓTICOS EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS	71
3.	PROPOSIÇÃO	81
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	83
4.1.	MEDICAMENTOS TESTADOS	83
4.2.	MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES E EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS	83
4.2.1.	SELEÇÃO DA AMOSTRA	83
4.2.2.	PROCEDIMENTOS CLÍNICOS	83

4.2.3.	COLETA DAS AMOSTRAS, INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO	84
4.2.4.	ISOLAMENTO MICROBIANO	86
4.2.5.	ESPECIFICAÇÃO MICROBIANA	87
4.2.6.	PREPARO DOS CANAIS RADICULARES E COLETA DAS AMOSTRAS	88
4.2.6.1.	PRIMEIRA SESSÃO DE ATENDIMENTO	88
4.2.6.2.	SEGUNDA SESSÃO DE ATENDIMENTO	89
4.2.6.3.	TERCEIRA SESSÃO DE ATENDIMENTO	90
4.2.6.4.	QUARTA SESSÃO DE ATENDIMENTO	90
4.3.	TESTE CROMOGÊNICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS LAL (QCL-1000, CAMBREX, WALKERVILLE, MD, USA)	91
4.3.1.	COLETA	91
4.3.2.	PADRONIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO	91
4.3.3.	PADRONIZAÇÃO DAS DILUIÇÕES DAS AMOSTRAS	92
4.3.4.	REALIZAÇÃO DOS TESTES	93
4.3.5.	CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA	95
4.4.	EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS ISOLADOS DOS CANAIS RADICULARES (E- TEST)	96
4.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	98
5.	RESULTADOS	101

5.1.	MICROBIOTA PRESENTE NOS CANAIS RADICULARES INFECTADOS CONTENDO POLPAS NECROSADAS E LESÃO PERIAPICAL	101
5.2.	EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS	103
5.3.	EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS ISOLADOS DOS CANAIS RADICULARES	120
6.	DISCUSSÃO	125
6.1.	MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES E EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS	125
6.1.1	MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES	125
6.1.2.	EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS	127
6.1.2.1.	MICRORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS E ENDOTOXINAS	131
6.1.2.2.	MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS	135
6.1.3.	EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS	137
7.	CONCLUSÃO	141
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

	ANEXOS	171
1.	DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAS DOS PACIENTES	171
2.	CERTIFICADOS DO COMITE DE ÉTICA	197
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO ESPECÍFICO PARA A PESQUISA	
	TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE	
3.	PUBLICAÇÕES, PROJETOS DE PESQUISA, CO- ORIENTAÇÕES DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	207
4.	PUBLICAÇÕES COMPLETAS SOBRE MICROBIOLOGIA E TERAPIA ENDODÔNTICA (2003-2006)	215
4.1.	MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES	215
4.2.	REDUÇÃO MICROBIANA	223
4.3.	SOLUÇÕES IRRIGADORAS	229
4.4.	MEDICAMENTOS INTRACANAIS	237
4.5.	MATERIAIS OBTURADORES	245

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estabelecimento de uma curva padrão nas concentrações 1,0 EU/ml, 0,5 EU/ml, 0,25 EU/ml e 0,1 EU/ml	92
Tabela 2.	Procedimentos para realização do teste cromogênico LAL (QCL-1000)	93
Tabela 3 .	Número de casos e microrganismos antes e após intervenções endodônticas	107
Tabela 4.	Número de casos e microrganismos da Coleta 5 dividida de acordo com as diferentes medicações intracanaís	108
Tabela 5.	Distribuição dos microrganismos isolados nas diversas coletas durante o tratamento endodôntico de acordo com as características morfológicas	109
Tabela 6.	Distribuição dos microrganismos isolados nas diversas coletas durante o tratamento endodôntico de acordo com as características morfológicas (continuação Tabela 5)	110
Tabela 7.	Distribuição dos microrganismos, agrupados de acordo com o gênero, isolados nas diversas coletas durante o tratamento endodôntico de acordo com as características morfológicas	111
Tabela 8.	Distribuição dos microrganismos da Coleta 5 divididos de acordo com os medicamentos utilizados	112
Tabela 9.	Microbiota encontrada nos canais radiculares na coleta inicial, antes e após remoção da medicação intracanal	113
Tabela 10.	Número total de espécies bacterianas encontradas em 24 canais radiculares em diferentes coletas, medianas e porcentagem em relação à soma das coletas iniciais	114

Tabela 11.	Número total de CFU por ml encontradas em 24 canais radiculares em diferentes coletas, medianas e porcentagem em relação à mediana das coletas iniciais	115
Tabela 12.	Quantificação de endotoxinas (EU/ml) antes e após procedimentos endodônticos	116
Tabela 13.	Quantidade de CFU/ml e endotoxinas (UE/ml) presentes em 24 canais radiculares contendo polpa necrosada e lesões periapicais após a utilização de medicamentos intracanais (C5)	118
Tabela 14.	Valores médios MIC50 e MIC90 em µg/ml de endodonto patógenos isolados de canais radiculares com lesão periapical	122
Tabela 15.	Valores médios MIC50 e MIC90 em µg/ml de endodonto patógenos isolados de canais radiculares com lesão periapical	123
Tabela 16.	Valores médios MIC50 e MIC90 em µg/ml de endodonto patógenos isolados de canais radiculares com lesão periapical	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Componentes celulares de microrganismos Gram-negativos	27
Figura 2.	Estrutura do LPS	28
Figura 3.	Participação do LPS na resposta imune clássica	30
Figura 4.	Disposição das amostras, curva padrão e controle negativo nas placas.	96
Figura 5.	E-Test	99
Figura 6.	Número total de UFC por mL (valores medianos) encontrados em 24 canais radiculares em diferentes coletas.	117
Figura 7.	Quantidade de endotoxinas (UE/mL, valores médios) antes e após procedimentos.	117
Figura 8.	Porcentagem do número total de espécies, valores médios da quantidade de endotoxinas (EU/mL) e valores medianos das unidades formadoras de colônia (CFU/mL) antes e após procedimentos endodônticos.	119

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a redução microbiana e de endotoxinas após o preparo químico-mecânico (PQM) e uso de medicamentos intracanais (MI) e a susceptibilidade de algumas espécies bacterianas frente a antimicrobianos. As amostras foram obtidas de dentes com polpa necrosada e lesão periapical, em diversas etapas do tratamento. Foram utilizados meios de transporte, cultura e incubação que proporcionaram o crescimento de microrganismos anaeróbios estritos. Os microrganismos foram identificados por testes bioquímicos padronizados e as endotoxinas quantificadas pelo teste Lisado de Amebócito de Limulus (LAL). O E-test foi utilizado para avaliar a susceptibilidade dos agentes antimicrobianos: benzilpenicilina, amoxicilina, eritromicina, azitromicina, cefaclor, amoxicilina+ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. Os resultados mostraram que as amostras coletadas dos canais radiculares com lesão periapical apresentaram microrganismos em todos os casos, as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) variaram de 4×10^5 a $2,6 \times 10^6$. Os microrganismos mais encontrados foram: *Propionibacterium acnes*, *Gemella morbillorum*, *Actinomyces naeslundii* e *Eubacterium lentum*. As endotoxinas estavam presentes em todas amostras iniciais, variando entre 62,93 e 214,56 UE/mL. O PQM mostrou redução de mais de 99% da microbiota e de 57% da concentração de endotoxinas. Após o uso da MI foram encontrados microrganismos em 54% dos casos, a concentração de endotoxina aumentou consideravelmente comparada ao primeiro PQM. Não houve diferenças estatísticas entre os MI testados. Os antimicrobianos mais eficazes foram a amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. *Fusobacterium* sp. mostraram certa resistência a eritromicina e clindamicina. Em conclusão, os resultados microbiológicos sugerem que o PQM foi responsável pela maior redução na quantidade de microrganismos e endotoxinas. A amoxicilina ou amoxicilina + ácido clavulânico devem ser as medicações de primeira escolha quando necessário o emprego de um agente antimicrobiano via sistêmica, para pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos a azitromicina seria uma alternativa.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate *in vivo* the microbial and endotoxins load after chemo-mechanical preparation (CMP) and after the use of intracanal medications (ICM), it was also aimed to evaluate *in vitro* the antimicrobial susceptibility from some microorganisms isolated. Samples were collected of single root teeth containing necrotic pulp tissue and periapical bone lesions, in several stage of the endodontic treatment. Transport medium, culture and incubation in favour of strict anaerobic microorganisms to grow were used. Microorganisms were identified by biochemical tests and endotoxins quantified by Limulus Amebocyte lysate (LAL) test. Antimicrobial susceptibility was evaluated by E-test method using the following antibiotics: benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin + clavulanate, erythromycin, azithromycin, cephaclor, metronidazole, and clindamycin. Results showed that microorganisms were present in all teeth containing necrotic pulp tissue and periapical bone lesion, the colony forming unit (CFU/mL) ranged from 4×10^5 to 2.6×10^6 . The microorganisms most frequent isolated were *Propionibacterium acnes*, *Gemella morbillorum*, *Actinomyces naeslundii* and *Eubacterium lentum*. Endotoxin was also present in all initial samples, ranging from 62.93 to 214.56 UE/mL. Post CMP samples showed more than 99% reduction of cultivable microbiota and 57% (mean value) of endotoxin concentration. After 7 days of ICM, residual microorganisms were still found in 54.1% of the cases and the endotoxin concentration increased considerably compared to the first CMP. No statistically significant differences among the intracanal medicament groups were found. In conclusion, the microbiological results suggested that CMP was responsible for the majority of the microbial and endotoxin reduction. Amoxicillin and amoxicillin plus clavulanic acid were the best antimicrobial agents, as all bacterial strains tested were susceptible to their action. Some *Fusobacterium* spp. showed to be resistant to erythromycin. In conclusion, the microbiologic results suggest that chemo-mechanical preparation was responsible for mainly microbial and endotoxin reduction. Amoxicillin and amoxicillin plus clavulanic acid are the first choice when required to use a systemic antimicrobial agent, as alternative to allergic patients the azithromycin is an option.

1. INTRODUÇÃO

A eliminação dos microrganismos dos canais radiculares infectados tem sido uma constante preocupação em Endodontia, demonstrada por pesquisas que avaliaram a eficácia da instrumentação mecânica, influência da irrigação, medicação intracanal e sistêmica (Byström & Sundqvist, 1981, 1983; Tronstad *et al.*, 1990). Ainda hoje, o melhor e mais seguro método utilizado para descontaminar o sistema de canais radiculares é a criteriosa limpeza do conteúdo séptico-necrótico (Schilder, 1974), uma vez que os microrganismos presentes em canais radiculares necrosados não podem ser alcançados pelas células de defesa do hospedeiro (Takahashi, 1998).

O preparo químico-mecânico do canal radicular reduz significativamente os microrganismos predominantes na microbiota endodôntica (Byström & Sundqvist, 1981; Peters *et al.*, 2002). Entretanto, microrganismos persistentes sobrevivem, não somente pela incapacidade do preparo químico-mecânico em removê-los das complexidades anatômicas, mas também porque alguns nutrientes capazes de favorecer o crescimento destes microrganismos residuais, irão, inevitavelmente, ali permanecer e tais microrganismos multiplicar e restabelecer a contaminação do espaço pulpar (Byström *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 1996; Siqueira & Lopes, 1999).

Vários trabalhos mostraram a importância da medicação intracanal com o objetivo de potencializar a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários e impedir que os microrganismos se multipliquem no intervalo entre as sessões de tratamento (Byström & Sundqvist, 1981, 1983; Byström *et al.*, 1985). A medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizada devido às suas propriedades físicas e biológicas (Byström *et al.*, 1985). As propriedades do Ca(OH)_2 derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que as ações destes íons promovem propriedades biológicas e antimicrobianas (Spangberg, 1994).

Estudos *in vivo* indicam que o hidróxido de cálcio, usado como medicamento intracanal, leva à redução ou eliminação dos microrganismos

presentes nos canais radiculares (Byström *et al.*, 1985; Ørstavik *et al.*, 1991; Sjörgreen *et al.*, 1991). Porém, *in vitro*, o Ca(OH)_2 apresenta-se ineficaz, seja em testes utilizando dentes humanos extraídos infectados (Estrela *et al.*, 1999), dentes bovinos extraídos infectados (Safavi *et al.*, 1990; Gomes *et al.*, 2003), testes de difusão em agar (Di Fiore, 1983; Gomes *et al.*, 2002) ou diluição em caldo (Haapasalo *et al.*, 2000).

Sabe-se que a eficácia de um medicamento intracanal depende da vulnerabilidade das espécies envolvidas (Gomes *et al.*, 1996). Além disso, a baixa difusão de íons hidroxila através da dentina infectada, ou mesmo a capacidade tampão da dentina podem impedir a ação da pasta de hidróxido de cálcio (Haapasalo *et al.*, 2000). Assim, o uso de medicamentos alternativos, por exemplo, a clorexidina, seria uma opção de tratamento, por possuir atividade antimicrobiana frente a esses microrganismos resistentes, como por exemplo os enterococos (Siqueira & Uzeda, 1996; Síren *et al.*, 1997, Molander *et al.*, 1998; Waltimo *et al.*, 1997, 1999; Haapasalo *et al.* 2000; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004, Gomes *et al.*, 2006). Entretanto, a clorexidina apesar de sua ampla atividade antimicrobiana, não apresenta as propriedades biológicas ou físicas do hidróxido de cálcio. Por meio da associação da clorexidina com Ca(OH)_2 busca-se uma medicação com a capacidade de induzir a mineralização dos tecidos, amplo espectro antimicrobiano com ação residual, baixa toxicidade aos tecidos e ainda funcionar como barreira física.

O Ca(OH)_2 além de ser utilizado no combate a microrganismos, também tem sido preconizado para a neutralização das endotoxinas bacterianas. Endotoxina é um complexo lipopolissacarídico (LPS) presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, que mesmo após a morte celular continua desencadeando a reação inflamatória, induzindo a febre, citotoxicidade e reabsorção óssea (MacKane *et al.*, 1986). Estudos têm mostrado que o LPS é inativado pela ação do Ca(OH)_2 (Estrela *et al.*, 1995; Tanomaru *et al.*, 2002), enquanto que a clorexidina não atua sobre ele (Tanomaru *et al.*, 2002). Entretanto, nenhum estudo clínico até então foi realizado para

verificar a ação das substâncias químicas utilizadas na endodontia sobre o LPS bacteriano.

O teste cromogênico de Lisado de Amebócito de Limulus (LAL) é um teste eficaz para detectar e quantificar endotoxinas. Khabbaz *et al.* (2001) utilizaram este teste para determinar a presença de endotoxinas em polpas vitais de dentes cariados, fazendo uma associação com a dor pulpar. Um dos propósitos do presente estudo foi verificar a quantidade de endotoxina presente nos canais radiculares antes e após a instrumentação, e antes e após a utilização de medicação intracanal por 7 dias.

Na endodontia, além dos procedimentos locais de combate à infecção, em algumas ocasiões, faz-se necessário o emprego de medicação sistêmica. Os antibióticos só devem ser usados, em algumas situações clínicas, como na profilaxia antibiótica de pacientes de risco para a endocardite bacteriana durante a terapêutica endodôntica, ou em conjunto com o debridamento mecânico e processos de drenagem em situações agudas, quando as infecções periapicais agudas apresentarem sinais e sintomas de disseminação do processo infeccioso tais como febre, mal estar, celulite ou trismo (Abbott *et al.*, 1990; Souza-Filho & Andrade, 2006). Porém estes não devem ser empregados rotineiramente devido ao desenvolvimento de microrganismos resistentes (Morse, 1987).

A concentração de um antibiótico necessária para inibir o crescimento microbiano *in vitro* é avaliada por testes de susceptibilidade antimicrobiana (Forbes *et al.*, 1998). O método E-test que utilizado neste estudo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a susceptibilidade microbiana às drogas testadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES

Os microrganismos estão em todos os lugares, mas o ambiente os seleciona. Na cavidade bucal existem aproximadamente 10^{10} bactérias (Mims *et al.*, 1995) consistindo de mais de 700 diferentes espécies de microrganismos (Aas *et al.*, 2005), os quais buscam por um nicho e nutrição. Uma das funções primárias do esmalte dentário é excluir esses microrganismos do complexo dentina-polpa. Em condições normais, as camadas de esmalte e cemento estão intactas, a polpa e o canal radicular protegidos da invasão. Entretanto, a perda destas estruturas por cáries, trincas ou trauma abrem um caminho para penetração das bactérias através dos túbulos dentinários. Todas as bactérias na cavidade bucal têm a oportunidade de invadir do espaço do canal radicular. Entretanto, apenas um grupo restrito de espécies tem sido identificado em canais radiculares infectados (Kantz & Henry, 1974; Wittgow & Sabiston, 1975; Sundqvist 1994). As interações entre fatores microbiológicos e disponibilidade de nutrientes são os principais elementos que definem a composição da microbiota bucal (Sundqvist & Figdor, 2003).

Na fase inicial de uma infecção no canal radicular, o número de espécies microbianas normalmente é pequeno. Se a via de invasão for por meio de cárie, as bactérias da lesão cariogênica são as primeiras a invadirem a polpa. Nos casos onde não há comunicação aparente com a cavidade oral, as bactérias penetram através dos túbulos dentinários, como pode ocorrer nos casos de trauma sem exposição pulpar (Sundqvist, 1976). O número de espécies em canais radiculares infectados pode variar de 1 a mais de 12, e o número de células bacterianas pode variar de $< 10^2$ a $>10^8$ por canal radicular (Sundqvist & Figdor, 2003).

2.1.1. MICROBIOTA BUCAL E DO CANAL RADICULAR

As doenças da cavidade oral, predominantemente cárie e doença

periodontal, desenvolvem-se em lugares onde um biofilme já está estabelecido. Estas doenças ocorrem devido a mudança nas condições ambientais, o tipo e as combinações microbianas presentes no momento. Assim, mudanças na superfície dental, com o aumento do número de microrganismos acidogênicos, resultam na desmineralização, provocando cáries. Um aumento no número de bactérias proteolíticas no sulco gengival resultam no desenvolvimento da doença periodontal (Marsh, 2003). A infecção dos canais radiculares é única na cavidade oral, visto que ela se estabelece em um ambiente previamente livre de microrganismos (Sundqvist & Figdor, 2003).

2.1.2. OS CANAIS RADICULARES SÃO NICHOS ÚNICOS DE INFECÇÃO

A maioria dos casos de necrose pulpar é decorrente da invasão bacteriana (via lesão de cárie) e produção de toxinas. Estes microrganismos e seus subprodutos chegam à luz do canal, penetram nos túbulos dentinários e propagam-se por todo o sistema de canais radiculares, incluindo ramificações, istmos e deltas apicais, alcançando a região periapical e causando as periodontites apicais (Nair, 1987; Baumgartner & Falkler, 1991; Sjögren *et al.*, 1991).

O primeiro pesquisador a descrever a presença de bactérias no interior do canal radicular e associá-las às patologias pulpares e perirradiculares foi Miller em 1894. O autor examinou esfregaços obtidos de canais radiculares com câmara pulpar aberta e presença de polpas necróticas. Uma ampla variedade de formas bacterianas foi observada (cocos, bacilos e espirilos), como também que algumas espécies localizavam-se na câmara pulpar enquanto outras no interior do canal radicular. Muito mais tarde, estes achados foram confirmados por Kakehashi *et al.* (1965) quando, ao utilizarem ratos como modelo experimental, evidenciaram o papel desempenhado pelas bactérias e seus produtos na indução das infecções pulpares e perirradiculares. Expuseram, ao meio bucal, polpas de molares de ratos convencionais e "*germ free*". Verificaram que nos animais convencionais

ocorreu o desenvolvimento de inflamação crônica culminando com necrose pulpar e lesões perirradiculares, enquanto que nos animais "*germ free*" a resposta pulpar foi caracterizada pela presença mínima de inflamação e por deposição de dentina neoformada na área exposta, demonstrando a importância da presença de microrganismos na instalação das infecções endodônticas.

Até a metade da década de 70, devido ao desconhecimento das técnicas de anaerobiose, investigações relatavam que os microrganismos isolados dos canais radiculares com polpas necrosadas eram predominantemente bactérias anaeróbias facultativas do grupo dos estreptococos, enterococos, micrococos, difteróides, estafilococos, lactobacilos, bactérias entéricas, *Candida* spp., *Neisseria* spp. e *Veillonella* spp. (Morse, 1987; Gomes, 1995).

Möller *et al.* (1981) induziram necrose pulpar em dentes de macacos, quando um grupo de dentes foi manipulado de forma asséptica, no outro grupo, as polpas ficaram expostas a microbiota bucal por um período de uma semana. Em seguida, os dentes foram selados. Os autores concluíram que lesões perirradiculares desenvolveram-se apenas nos casos em que houve contato com a microbiota oral, ou seja, quando as polpas foram infectadas.

Sundqvist (1976) avaliou a microbiota de 32 canais radiculares de dentes unirradiculares com polpas necrosadas devido à injúria traumática. Constatou que 19 dentes estavam infectados e cerca de 90% dos isolados eram bactérias anaeróbias estritas.

Os achados de Sundqvist (1976) foram confirmados posteriormente por e Möller *et al.* (1981), Byström & Sundqvist (1983) e Baumgartner & Falkler (1991), pela constatação da prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares infectados, inclusive nos 5,0 mm apicais. Diferenças na disposição de nutrientes e tensão de oxigênio na região apical comparadas à porção principal do canal radicular são as razões para a predominância de bactérias anaeróbias de crescimento lento na porção apical.

Estudos da dinâmica da infecção dos canais radiculares têm mostrado que a proporção relativa de microrganismos anaeróbios estritos e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) aumentam de acordo com o tempo. Fabricius *et al.* (1982a) verificaram a dinâmica da colonização microbiana no canal radicular em dentes de macaco, considerando as variações de tempo (7, 90, 180 e 1060 dias) e localização (luz do canal, dentina radicular e ápice radicular). Os resultados mostraram que a ecologia mudou progressivamente: aos 7 dias houve equilíbrio entre cocos, bacilos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos. No período de 3 a 6 meses verificaram a presença de anaeróbios facultativos estritos na luz do canal, porém na dentina e ápice radicular a microbiota predominante era de anaeróbios estritos. Ao término do período experimental houve predominância de anaeróbios estritos, principalmente bacilos Gram-negativos.

Esses mesmos autores (Fabricius *et al.*, 1982b) avaliaram a importância do sinergismo microbiano para potencializar a patogenicidade da microbiota do canal radicular. Os autores inocularam cepas bacterianas em várias combinações no interior de canais radiculares de macacos para estudar o potencial de sobrevivência e a capacidade de induzirem a formação de lesões periapicais. Reações periapicais leves foram observadas nos casos em que as bactérias foram inoculadas individualmente, enquanto nos casos em que foram inoculadas associações bacterianas, houve reações periapicais mais severas. Esses achados mostram que o “milieu” endodôntico é um “habitat” seletivo que suporta o desenvolvimento proporcional de microrganismos anaeróbios. O oxigênio e produtos do oxigênio são importantes determinantes na proporção de microbiota específica nos canais radiculares (Loesch, 1968; Carlsson *et al.*, 1977; Loesch *et al.*, 1983). O consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono e hidrogênio, juntamente com o desenvolvimento do potencial de óxido-redução pelos colonizadores precursores, favorecem o crescimento de microrganismos anaeróbios (Sundqvist & Figdor, 2003).

2.1.3. NUTRIÇÃO COMO UM GUIA ECOLÓGICO

O tipo e a disponibilidade de nutrientes são importantes fatores no crescimento microbiano. Os nutrientes podem derivar da cavidade oral, da degradação de tecido conjuntivo (Loesch, 1968), de restos de tecido orgânicos nos túbulos dentinários, ou fluidos dos tecidos periapicais (Love, 2002). Esses fatores no sistema de canais radiculares permitem o crescimento de microrganismos anaeróbios capazes de fermentar amino-ácidos e peptídeos, enquanto que os microrganismos colonizadores iniciais obtêm energia pela fermentação de carboidratos, o qual se torna limitado no interior dos canais radiculares (Sundqvist, 1992b; Sundqvist, 1994). Esta parece ser a razão da microbiota dos canais radiculares ser predominantemente de bactérias anaeróbias facultativas, como por exemplo, de estreptococos na porção coronária, e anaeróbios estritos na porção apical (Miller 1894, Fabricius *et al.*, 1982).

A substituição dos microrganismos facultativos pelos anaeróbios de acordo com o tempo (Mims *et al.* 1995; Fabricius *et al.* 1982b) parece estar relacionada aos fatores nutricionais, assim como a um decréscimo na disponibilidade de oxigênio. Microrganismos anaeróbios facultativos crescem bem em ambientes anaeróbios, entretanto, suas fontes de energia primárias são os carboidratos. Uma queda na disponibilidade de carboidratos nos canais radiculares ocorre quando não há uma comunicação direta com a cavidade oral, o que limita seriamente o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos. As interações bacterianas são decorrentes das necessidades da cadeia alimentar, na qual o próprio metabolismo de algumas espécies produz os nutrientes essenciais para o desenvolvimento de outras (Sundqvist, 1992b; Sundqvist, 1994; Gomes *et al.*, 1994).

Ter Steeg e van der Hoeven (1989) contribuíram para o entendimento da dinâmica dos microrganismos nos canais radiculares. Os autores utilizaram plasma sanguíneo como substrato e estudaram as substituições dos microrganismos da placa subgingival durante a fase de crescimento. Inicialmente

houve um crescimento rápido de bactérias sacarolíticas, consumindo pequenos níveis de carboidratos presentes no plasma. Como resultado metabólico houve a produção de ácidos láctico e fórmico. Na fase seguinte as proteínas foram hidrolisadas, com a fermentação de algumas cadeias de amino-ácidos e a digestão dos carboidratos remanescentes. O crescimento durante essa fase foi predominantemente de *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvulla*, *Fusobacterium nucleatum* e *Eubacterium* spp. Na fase final as espécies predominantes foram *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e eubactérias. A predominância de *P. micros* também foi evidenciada no estudo de Person *et al.* (1990).

Os bacilos produtores de pigmento negro (BPPG), como *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* são capazes de degradar proteínas séricas tornando os peptídeos e amino-ácidos disponíveis para fermentação (Sundqvist *et al.*, 1985). A degradação de proteínas pelas espécies *Prevotella* e *Porphyromonas* torna possível o crescimento de bactérias que dependem da disponibilidade de peptídeos, como por exemplo, as eubactérias, fusobactérias e peptostreptococos, os quais produzem peptidases, mas não conseguem degradar proteínas intactas (Jansen & van der Hoeven, 1997; Jansen, 1996). Esse sinergismo é importante para capacidade desses microrganismos induzirem a formação de abscessos periapicais (Sundqvist, 1976). Combinações de *P. micros* com *P. intermedia* ou *P. endodontalis* têm sido implicadas na formação de abscessos periapicais (Sundqvist *et al.*, 1979).

O crescimento de populações mistas de microrganismos dependem das cadeias alimentares e do metabolismo das espécies que fornecem nutrientes essenciais para o crescimentos de outras espécies (Lev *et al.*, 1971; Grenier & Mayrand, 1986; Marsh, 1989; Ohta *et al.*, 1991; Jansen & van der Hoeven, 1997). Os bacilos produtores de pigmento negro (*Prevotella* e *Porphyromonas*) são exemplos de bactérias que requerem uma nutrição bem específica. Eles dependem de vitamina K e hemina para seus crescimentos. A Vitamina K pode ser

produzida por outras bactérias (Gibbons *et al.*, 1964), enquanto que a hemina torna-se disponível pela quebra da hemoglobina. Entretanto, poucas bactérias podem produzir hemina, como por exemplo *Camphylobacter rectus*, o qual estimula o crescimento de *Porphyromonas* (Grenier & Mayrand, 1986). *C. rectus*, por serem microrganismos estritamente anaeróbios, necessitam de fontes de energia de outros microrganismos que produzem hidrogênio, como por exemplo as *Porphyromonas* sp. Uma grande gama de interações nutricionais está presente entre os microrganismos da cavidade oral, fato este que pode também influenciar as associações entre os microrganismos do interior dos canais radiculares (Carlsson, 1990; Sundqvist, 1992 a, b).

Como os fatores nutricionais controlam a dinâmica da microbiota oral, isso significa que a presença de determinados microrganismos nos canais radiculares vai depender do estágio em que a infecção se encontra. Inicialmente pode não haver associações claras entre espécies, mas associações positivas fortes podem ocorrer entre um grupo restrito de microrganismos devido aos fatores nutricionais (Sundqvist, 1992 a, Gomes *et al.*, 1994; Lana *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2002). Como por exemplo, a associação entre *F. nucleatum*, *P. micros* e *C. rectus* (Sundqvist, 1992 a), ou *P. intermedia* e *P. micros* (Sundqvist, 1992 a; Peters *et al.*, 2002) e *P. anaerobius* (Sundqvist, 1992 a). Em geral as espécies do gênero *Eubacteria* spp., *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus* spp. estão positivamente associadas a outros endodonto-patógenos (Sundqvist, 1992 a; Gomes *et al.*, 1994, Peters *et al.*, 2002). Esses microrganismos possuem em comum o fato de fermentarem peptídeos e amino-ácidos, além de serem anaeróbios (ter Steeg & van der Hoeven, 1989). Isso indica que existe uma fonte de nutrientes nos canais radiculares, pois nestes há remanescentes de tecidos orgânicos e substratos, como glicoproteínas séricas (Sundqvist & Figdor, 2003).

A maioria das espécies isoladas dos canais radiculares também tem sido identificada em bolsas periodontais (Moore & Moore, 1994). Apesar da microbiota dos canais radiculares não ser tão complexa quanto a das bolsas periodontais,

ambos possuem similaridades, especialmente na variedade limitada da microbiota. Comparando a microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais, Kobayashi *et al.* (1990) verificaram que a proporção entre microrganismos anaeróbios e facultativos é aproximadamente 100 vezes maior nos canais radiculares. *Streptococcus* anaeróbios são encontrados facilmente nos canais radiculares, entretanto raramente nas bolsas periodontais. Em contraste, *Streptococcus* facultativos são freqüentemente encontrados nas bolsas periodontais. Bactérias freqüentemente encontradas nos canais radiculares, mas raramente nas bolsas periodontais são os *Peptostreptococcus* spp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *P. intermedia* e *Veillonella parvula*. Bactérias encontradas freqüentemente nas bolsas periodontais, mas em baixa freqüência em canais radiculares são *Prevotella melaninogenica*, *Eikenella corrodens* e *P. gingivalis* (Sundqvist & Figdor, 2003).

Os microrganismos isolados, com maior freqüência dos canais radiculares infectados são predominantemente os anaeróbios estritos, como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga*. Menos freqüentemente são *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wolinella* spp. Os anaeróbios facultativos mais comuns são cocos, os gêneros *Enterococcus* e *Gemella*. É relatada a presença ocasional de espécies *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus* spp. Mais raramente são isolados *Hafnia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter* e *Alcaligenes* spp. e os aeróbios *Mycobactéria*, *Nocardia*, *Mima*, *Pseudomonas* e *Micrococcus* spp. (Baumgartner & Falkler, 1991; Sundqvist, 1994; Gomes, 1995). Também foram isoladas espiroquetas (Thilo *et al.*, 1986; Nair, 1987), *Mycoplasma* (Serene & Anderson, 1967) e *Candida* (Sen *et al.*, 1995; Siren *et al.*, 1997).

Visto que a infecção endodôntica tem se mostrado uma infecção mista com grande número de microrganismos Gram-negativos (Gomes *et al.*, 1996 a,b,

2004), estes microrganismos merecem uma atenção especial pois possuem fatores de virulência diferenciados. Estes fatores são responsáveis por produtos e subprodutos bacterianos que são tóxicos às áreas periapicais. Um desses fatores de virulência é a presença de uma membrana celular diferenciada com a presença de polissacarídeos (polímeros de açúcares), lipídeos (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas. Essa estrutura é denominada Lipopolissacáride ou endotoxinas (Westphal, 1975; Rietschel & Brade, 1992) que será discutido mais adiante (2.1.6. ENDOTOXINAS).

2.1.4. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Com a finalidade de identificar os microrganismos e estudar suas características e patogenicidade, diversos métodos para coleta e identificação tem sido utilizados. Basicamente existem dois métodos, a) de colheita, isolamento e identificação por intermédio de testes bioquímicos e b) método das técnicas moleculares, que utilizam seqüências de ácidos nucleicos para identificação microbiana. A maioria dos estudos moleculares utiliza a porção 16 sRNA, entretanto há estudos que utilizam outros genes (Lepp *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2006 b).

2.1.4.1. MÉTODO DA CULTURA DE MICRORGANISMOS

Sundqvist (1976) realizou um estudo que representou um marco na literatura endodôntica, pois utilizou técnicas propícias para a identificação de microrganismos anaeróbios estritos. O autor avaliou microbiologicamente 32 canais radiculares de dentes unirradiculares com polpas necrosadas devido à injúria traumática e com coroas intactas (sem cáries ou restaurações). Bactérias anaeróbias estritas representaram cerca de 90% dos isolados. As bactérias mais freqüentemente isoladas foram '*Bacteroides melaninogenicus*', *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp. e *Peptostreptococcus* spp. Foram encontradas bactérias apenas nos casos de dentes com lesões perirradiculares (18 casos positivos de

um total de 19 casos) e houve uma correlação positiva entre o tamanho da lesão perirradicular e o número de espécies bacterianas presentes nos canais radiculares.

Yoshida *et al.* (1987) avaliaram a microbiota de 36 dentes com lesões periapicais. Neste estudo, as bactérias mais encontradas foram '*Peptococcus magnus*' (atualmente *Peptostreptococcus magnus*). As bactérias produtoras de pigmento negro (BPPN) estavam associadas a casos sintomáticos e *Streptococcus* spp. e bactérias entéricas associados a casos sem sintomatologia dolorosa.

Sundqvist *et al.* (1989) avaliaram 72 canais radiculares de dentes com lesões periapicais. Destes, 22 continham uma ou mais espécies de BPPN. A maioria da microbiota desses canais era anaeróbia estrita (95,4%), sendo que 16 deles estavam associados a abscesso periapical agudo e drenagem purulenta via canal.

Haapasalo (1989) investigou microbiologicamente 62 canais radiculares infectados, especialmente em relação à ocorrência, papel e taxonomia dos *Bacteroides* spp. Todas as infecções, com exceção de uma, mostraram ser infecções mistas, dominadas por microrganismos anaeróbios estritos.

van Winkelhoff *et al.* (1992) revisaram o papel da *Porphyromonas endodontalis* nas infecções endodônticas. *P. endodontalis* apresenta uma baixa virulência em mono-infecções experimentais, porém exerce um papel importante em infecções anaeróbias mistas. BPPN, incluindo *P. endodontalis* possuem um elevado potencial de degradar proteínas séricas e tornar peptídeos e aminoácidos disponíveis para outros microrganismos, como por exemplo para *P. micros*.

Gomes *et al.* (1994, 1996) analisaram 30 e 70 casos de canais radiculares infectados, respectivamente. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Streptococcus milleri*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus sanguis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus anginosus*. Várias associações positivas entre microrganismos foram encontradas (Gomes *et al.*, 1996).

Peters *et al.* (2002) investigaram as combinações entre bactérias isoladas de 58 canais radiculares infectados de dentes com lesão periapical. Relações significantes foram encontradas entre *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella oralis*, *Actinomyces odontolyticus* e *Peptostreptococcus micros*, *Bifidobacterium* spp. e *Veillonella* spp. Esses resultados sugerem que patógenos endodônticos não ocorrem aleatoriamente, mas são encontrados em combinações específicas.

Villanueva (2002) estudou a microbiota de 28 canais radiculares de pacientes que procuraram tratamento de emergência após início da terapia endodôntica. *Fusobacterium nucleatum* pareceu estar relacionado às formas mais severas de reagudecimento entre sessões do tratamento endodôntico.

Sousa *et al.* (2003) investigaram a microbiota de canais radiculares associados com abscessos periapicais. Foram examinados 32 canais radiculares e isolados 117 microrganismos, 75% deles eram anaeróbios estritos ou espécies microfílicas. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Peptostreptococcus prevotti*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum*. Os autores concluíram que bactérias anaeróbias Gram-positivas predominam nas infecções mistas de canais radiculares com abscessos periapicais.

Jacinto *et al.* (2003, 2006) analisaram a microbiota de 70 amostras de canais radiculares de dentes com abscessos periapicais. Foram isoladas 352 cepas, pertencendo a 69 diferentes espécies, 83% dos microrganismos isolados eram anaeróbios estritos e 47,5% Gram-negativos. Os canais continham no máximo 9 espécies e um canal foi negativo para presença de microrganismos. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Fusobacterium necrophorum*, *Peptostreptococcus prevotti*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Gemella morbillorum* e *Veillonella* spp.

Gomes *et al.* (2004) investigaram a microbiota dos canais radiculares de infecções primárias e secundárias. As amostras foram coletadas de 60 canais

radiculares (41 com infecções primárias, 19 secundárias). Foram isolados um total de 224 microrganismos pertencendo a 56 diferentes espécies, que variaram entre 1 a 10 espécies por canal. Setenta por cento dos microrganismos isolados eram anaeróbios estritos. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia/nigrescens* e *Porphyromonas endodontalis*. A microbiota dos canais radiculares com infecções primárias mostrou ser mista com a maioria dos microrganismos anaeróbios, contendo em média 3 espécies por canal. Os autores concluíram que a microbiota dos canais radiculares de dentes com infecções primárias difere da microbiota dos canais radiculares com infecções secundárias.

Chu *et al.* (2005) identificaram microrganismos cultiváveis de infecções primárias com e sem exposição da câmara pulpar. Foram avaliados 43 canais com polpas expostas e 43 sem exposição. Dos canais com câmara exposta foram isolados um total de 211 microrganismos, pertencendo a 28 diferentes gêneros e 55 espécies. Dos canais com câmara fechada foram isolados 185 microrganismos, pertencendo a 54 diferentes espécies e 28 gêneros. Os gêneros mais comuns foram *Prevotella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus* e *Camphylobacter*. As espécies *Fusobacterium nucleatum* e *Propionibacterium acnes* estiveram presentes em semelhante proporção nos canais com e sem exposição pulpar. A similaridade entre espécies de microrganismos encontradas sugere que a exposição da câmara pulpar não é um fator determinante para seleção da microbiota dos canais radiculares.

2.1.4.2. MÉTODOS MOLECULARES

Nas últimas décadas as técnicas moleculares tem contribuindo para a detecção de várias espécies, aumentando a gama da microbiota típica dos canais radiculares infectados. Como por exemplo, a detecção de espiroquetas (Roças *et al.*, 2003), *Tanarella forsythia* e *Treponema denticola* (Vianna *et al.*, 2005) nos

canais radiculares.

Bogen & Slots (1999) usaram o método PCR para detectar a presença de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em 20 lesões periapicais de dentes fechados, associados a infecções endodônticas persistentes (sintomáticas e assintomáticas). *P. endodontalis*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* não foram detectadas em nenhuma das lesões periapicais estudadas. Segundo esses autores, a baixa ocorrência de BPPN em lesões periapicais de dentes fechados poderia explicar a estabilidade relativa da doença.

Gatti *et al.* (2000) investigaram a presença de bactérias em 36 lesões periapicais removidas cirurgicamente de pacientes com periodontite apical assintomática pela técnica DNA-DNA hybridization. Todas as lesões continham DNA bacteriano. *Actinomyces naeslundii* e *Bacteroides forsythus* foram as bactérias mais encontradas. *Bacteroides fragilis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter concisus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter sputorum* ss *sputorum*, *Selenomonas noxia* e *Porphyromonas endodontalis* não foram encontradas em nenhuma das lesões periapicais.

Jung *et al.* (2000) investigaram microrganismos presentes em 38 canais radiculares (18 sintomáticos, 20 assintomáticos) por PCR e "dot-blot hybridization". Os microrganismos encontrados em maior frequência foram *Fusobacterium* spp. (68,4%), *Peptostreptococcus micros* (44,7%) e *Porphyromonas gingivalis* (26,3%). BPPN foram encontrados em 42,1% dos dentes incluídos no estudo. Associações significantes foram encontradas nas combinações de *B. forsythus* / *P. gingivalis* e *P. gingivalis* / *Treponema* spp.

Oliveira *et al.* (2000) avaliaram a ocorrência de *P. endodontalis* em 44 infecções endodônticas sintomáticas e assintomáticas usando 16s rRNA-PCR. *P. endodontalis* foi detectada em 39,5% dos casos. Sua prevalência relativamente alta em abscessos periapicais agudos sugere que esta bactéria tem potencial para ser um importante patógeno endodôntico.

Siqueira Jr. *et al.* (2000) examinaram a microbiota de 28 canais radiculares infectados utilizando Checkerboard DNA-DNA hybridization. O número de espécies bacterianas encontradas por canal variou de 1 a 17. As espécies mais prevalentes foram: *B. forsythus* (39,3% dos casos), *Haemophilus aphrophilus* (25%), *Corynebacterium matruchotii* (21,4%), *P. gingivalis* (17,9%) e *Treponema denticola* (17,9%). O estudo confirmou o conceito de que as infecções endodônticas são de etiologia polimicrobiana.

Xia *et al.* (2000) utilizaram PCR com primers específicos para *Prevotella tannerae* com o objetivo de examinar 118 amostras provenientes de infecções endodônticas. Sessenta por cento das amostras foram positivas para a presença de *P. tannerae*. Seus resultados sugerem que *P. tannerae* pode ser comumente encontrado em infecções endodônticas e pode ser um patógeno em potencial.

Siqueira Jr. *et al.* (2001b) utilizaram PCR para detectar a ocorrência de 4 BPPN (*P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*) em 54 canais radiculares infectados. BPPN foram detectados em 59,3% dos dentes examinados e em 80% dos dentes com abscesso periapical agudo. Mais de uma espécie de BPPN foi encontrada em 12 canais, especialmente as *Porphyromonas*.

Siqueira Jr. e Roças (2003 b) avaliaram por intermédio de “nested” PCR a presença de *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus* em infecções endodônticas primárias. Foram avaliados 57 dentes unirradiculares com lesões periapicais, necrose pulpar e evidência de lesão periapical. Vinte e oito casos foram classificados como assintomáticos com lesões periapicais crônicas, 12 com periodontite apical aguda e 12 com abscesso periapical. *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus* foram, respectivamente, detectados em 21,45% e 30% dos canais com periodontite apical crônica, *Campylobacter gracilis* foi encontrado em 16,7% dos casos de periodontite apical aguda e *Campylobacter rectus* em 33,3%. Nos casos de abscesso foram detectados *Campylobacter gracilis* em 23,5% dos casos e *Campylobacter rectus* em 11,8%. De forma geral foram encontrados *Campylobacter gracilis* em 21,3% *Campylobacter rectus* e em 23,3% de todos os

casos. Os autores concluíram que esses microrganismos participam das infecções endodônticas e sugerem que fazem parte das doenças perirradiculares.

Siqueira Jr. *et al.* (2003 a) avaliaram a presença de *Peptostreptococcus micros* em infecções endodônticas primárias pelo método de PCR. Foram coletadas amostras de 50 canais radiculares com lesões de cárie, polpas necrosadas e diferentes formas de doenças perirradiculares. Em geral *P. micros* foi encontrado em 28% dos casos (14/50) e dentre estes 6 apresentavam periodontite apical crônica (6/22). Os achados sugerem que *P. micros* está envolvido nas diversas formas de periodontite apical.

Siqueira Jr. *et al.* (2003 c) avaliaram por meio de “nested” PCR a presença de treponemas orais em infecções endodônticas primárias. Foram avaliadas 32 amostras de canais radiculares. Os resultados mostraram que *Treponema denticola* estava presente em 78,1% dos casos, *T. socranskii* em 40,6%, *T. vicentii* em 15,6% e *T. pactinovorum* em 9,4%. Pelo menos uma das espécies de treponema estava presente em 84,4% dos casos examinados. Os autores concluíram que as espiroquetas estão envolvidas em outras doenças orais e deveriam ser incluídas como endodonto-patógenos.

Siqueira Jr. e Roças (2003 d) avaliaram a presença de *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium* e *T. lecithinolyticum* em canais radiculares com infecções endodônticas primárias. Foram avaliadas 32 amostras utilizando nested PCR. Os resultados mostraram que todos os casos foram positivos para os microrganismos testados. Os mais freqüentemente encontrados em ordem decrescente foram : *T. maltophilum* (39%), *T. lecithinolyticum* (26%), *T. medium* (13%) e *T. amylovorum* (7%). Os autores concluem que as espécies de treponema, em especial *T. maltophilum* e *T. lecithinolyticum* fazem parte da patogenicidade das doenças perirradiculares.

Os mesmos autores Siqueira Jr. e Roças (2003 e), ainda avaliando o papel das espiroquetas, investigaram a presença de *Treponema socranskii* em infecções primárias detectadas por nested PCR. Foram avaliadas 60 amostras, esta espiroqueta esteve presente em 43 destas amostras, sendo 11 casos

assintomáticos, 12 casos de periodontite apical aguda e 20 de abscessos agudo. Os autores concluíram que esse microrganismo está envolvido nas diversas formas de lesões perirradiculares.

Siqueira Jr. e Roças (2004 b) avaliaram a presença de *Dialister pneumosintes* e *Filifactor alocis* em canais radiculares. Utilizaram a técnica de multiplex PCR investigando a região 16S rDNA. Ambas as espécies estiveram presentes nos canais radiculares, sugerindo que esses microrganismos são membros da microbiota presente em canais radiculares com infecções endodônticas primárias, e por isso, podem participar da etiologia das doenças perirradiculares.

Esses mesmos autores, Siqueira Jr. e Roças (2004 a), investigaram por “nested PCR” a presença de *Centipeda peridontii* em infecções endodônticas primárias e detectaram que ela estava presente em 14% das amostras analisadas, sendo 13% casos assintomáticos, 14% casos com periodontite apical aguda e 15% casos de abscesso. Os autores concluíram que há necessidade de novos esclarecimentos do papel dessa espécie nas infecções endodônticas.

Siqueira e Roças (2005) avaliaram novos filos e novas espécies associadas às infecções endodônticas. Vinte e uma amostras de dentes com necrose pulpar e 22 de infecções persistentes foram analisadas utilizando primers da região 16 rRNA e heminested PCR. Os resultados mostraram que as espécies mais freqüentemente encontradas foram *Dialister in visus* (81%), *Synergistes* oral clone BA121 (33%) e *Olsonella uli* (33%). A detecção desses novos microrganismos em canais radiculares infectados sugere que esses microrganismos participam da patogenia das doenças perirradiculares.

Roças & Siqueira (2005) avaliaram a ocorrência de duas espécies de treponema em canais radiculares com infecções primárias por intermédio do DNA de amostras clínicas utilizando nested PCR. Os resultados mostraram que *T. parvum* estava presente em 26% das infecções primárias, sendo 52% das amostras com periodontite apical crônica, 20% nos casos de periodontite apical aguda e ausente nos casos de abscesso. *T. putidum* foi encontrado em apenas

um caso de periodontite apical aguda. Os autores concluíram que esses microrganismos fazem parte das infecções endodônticas.

Vianna *et al.* (*in press*) quantificaram e caracterizaram microrganismos da divisão *Synergistes*. Foram avaliadas 32 amostras de dentes com necrose pulpar e lesões periapicais pelo método de PCR em tempo real (real-time PCR) com primers específicos para essa divisão. Foram encontrados 7 casos positivos para a presença de membros do grupo *Synergistes* e a quantidade por amostra positiva variou de 4.5×10^4 a 1.5×10^6 cópias de genes. Os autores concluíram que membros do grupo *Synergistes* podem ser de relevância clínica nas infecções endodônticas.

2.1.4.3. MÉTODOS DA CULTURA ASSOCIADOS A MÉTODOS MOLECULARES

Moraes *et al.* (2002) compararam a eficácia do método de cultura com os métodos moleculares 16S rDNA PCR e checkerboard DNA-DNA hybridization em detectar a presença de *Fusobacterium nucleatum*. Para isso, os autores utilizaram 13 canais radiculares de dentes infectados e com lesões periapicais. Não encontraram diferenças entre os 3 métodos na detecção de *F. nucleatum* diretamente das coletas clínicas, a despeito do pequeno número de amostras examinadas e da baixa prevalência do microrganismo.

Foschi *et al.* (2005) avaliaram pelo método de cultura e métodos moleculares a presença de *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* em canais radiculares infectados. Foram utilizados 62 dentes de 54 pacientes, 70% com infecções endodônticas primárias. *T. denticola* e *E. faecalis* foram detectados em 24% dos casos, *P. gingivalis* em 13%, *P. intermedia* em 8%, *T. forsythensis* em 7%. Os autores sugerem que essas espécies possuem um papel importante nas patologias endodônticas.

Vianna *et al.* (2005 b) avaliaram a microbiota dos canais radiculares de 20

dentes com necrose pulpar utilizando o método de cultura e o método molecular: microarray (DNA chip). Os microrganismos mais freqüentemente encontrados por DNA chip foram: *Micromonas micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Veillonella parvula*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus* e *Streptococcus constellatus*. *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* não puderam ser encontradas pelo método da cultura de microrganismos. Os autores concluíram que o DNA chip pode complementar os métodos de cultura para identificação da microbiota dos canais radiculares.

Gomes *et al.* (2005) avaliaram pelo método da cultura e PCR a presença de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em dentes com lesões periapicais. Amostras de 100 canais radiculares (50 com infecções primárias e 50 com secundárias). *P. gingivalis* foi raramente isolado por cultura (1%), entretanto, freqüentemente encontrado por PCR (38%). *P. endodontalis* não foi isolado por cultura, mas por PCR foi encontrada em 25% das amostras. *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram mais freqüentemente identificadas em casos de infecções primárias que secundárias. Entretanto a freqüência de microrganismos produtores de pigmento negro foi elevada utilizando ambos os métodos.

2.1.5. ARCHAEA NOS CANAIS RADICULARES

Toda vida celular se encontra nos três domínios: Bactéria, Eucária e Archaea (Woese *et al.*, 1990). Archaea difere geneticamente, bioquimicamente e estruturalmente das bactérias. “Archaeabacteria” tem sido classificada como um ramo (filogeneticamente) evolucionário das bactérias e representa uma forma primitiva de vida que habita ambientes extremos como altas temperaturas, águas lagos salgados, ou vulcões submarinos. Entretanto, um recente estudo mostrou que archaea é mais diversa fisiologicamente e ecologicamente espalhada do que se suspeitava, tendo sido identificada no trato gastrintestinal, mucosa vaginal e

bolsas periodontais, mas não sendo reconhecida como patógeno humano (Karlin *et al.*, 1982; Belay *et al.*, 1988; Lepp *et al.*, 2004).

Vianna *et al.* (2006 b) identificaram e quantificaram Archaea pela primeira vez em canais radiculares contendo polpa necrosada e lesões periapicais. Foram avaliados pelo método de reação de PCR em tempo real (real-time PCR) 20 canais radiculares com infecção endodôntica primária. Para tal utilizou-se de um gene funcional *mcrA* específico para methanogenic archaea e também se utilizou o gene 16s RNA. Os resultados mostraram que archaea estava presente em 5 casos (25%) e correspondia em até 2,5% da população procariótica (bactérias + archaea) presente nos canais radiculares. Os autores concluíram que a archaea pode estar intimamente relacionada a doenças infecciosas e por isso suporta a hipótese de que o domínio *Archaea* desempenha a função de patógeno humano.

2.1.6. ENDOTOXINAS

A Endotoxina bacteriana, ou seja, o lipopolissacarídeo bacteriano (LSP bacteriano) é um componente hidrofóbico presente na parte externa da membrana de microrganismos Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, e *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1) (Baron, 1996).

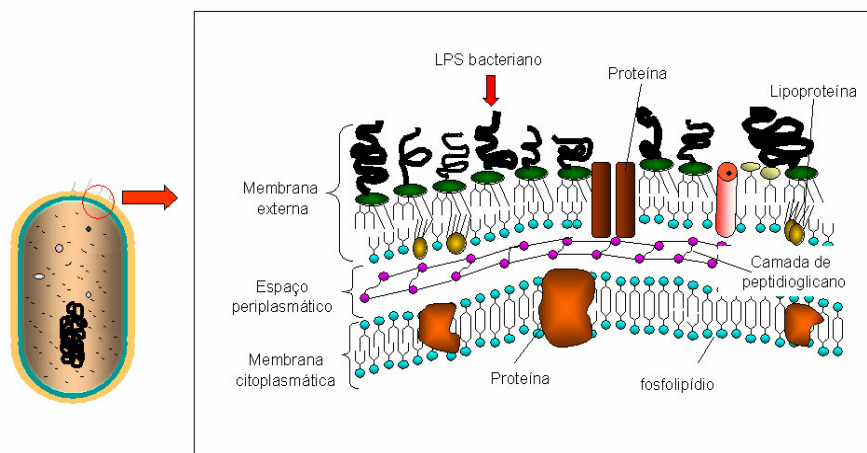


Figura 1. Componentes celulares de microrganismos Gram-negativos

O LPS é liberado quando a membrana bacteriana é rompida, e representa uma das mais potentes moléculas que ativam ao sistema imune. Ou seja, o LPS é liberado durante a multiplicação ou morte celular, causando efeitos biológicos, os quais levam à reação inflamatória e reabsorção óssea nas periodontites apicais (Leonardo *et al.*, 2004).

O LPS, em termos moleculares, é formado por um grupo bastante heterogêneo. O LPS mais estudado é de origem enterobacteriana (bactérias do intestino). Eles consistem de uma parte chamada lípide A, a qual se liga à membrana bacteriana. Em sua parte central há diferentes cadeias de açúcares e no outro extremo cadeias de polissacarídeos (Antígeno O) (Figura 2).

A porção denominada Lípide A exerce a maior parte das atividades endotóxicas e é chamada de princípio endotóxico do LPS. Historicamente, o LPS tem sido considerado como uma membrana externa essencial (“outer-membrane molecules”), a qual contém as maiores variações na porção Antígeno O. Entretanto, na última década, novas evidências têm emergido com relação à diversidade e heterogenicidade dos componetes do LPS, assim como da porção estrutural denominada lipide A, que até então era considerada estável a mudanças. Uma mudança em menor ou em maior proporção na lipide A pode produzir efeitos diversos na modulação da resposta imune (Dixon & Darveau, 2005).

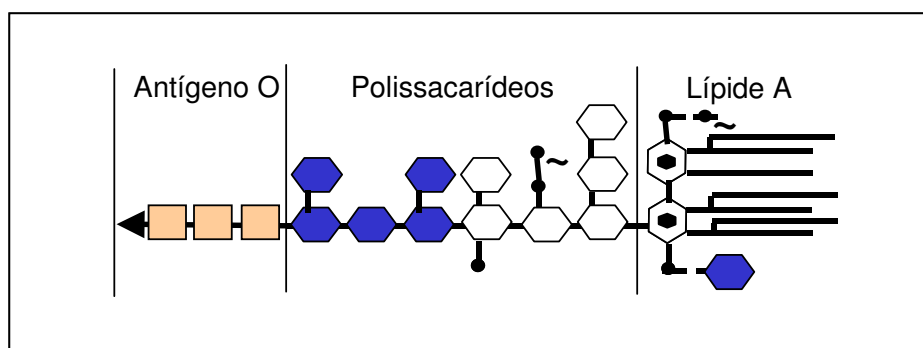


Figura 2: Estrutura do LPS

2.1.6.1. PARCIPAÇÃO DAS ENDOTOXINAS NA RESPOSTA IMUNE

As endotoxinas participam da resposta imune por meio da fagocitose de microorganismos Gram-negativos e liberação das endotoxinas no interior dos macrófagos levando à produção de interleucinas 1 (IL-1), que estimulam o hipotálamo, resultando em alteração na temperatura corporal.

As endotoxinas também participam da resposta imunológica por vários mecanismos designados a detectar e facilitar a resposta imunológica do hospedeiro contra os componentes microbianos. Para que essas respostas ocorram, o sistema imune dispõe de múltiplos receptores, como por exemplo, receptores de membrana dos macrófagos (CD14), proteínas circulantes e receptores Toll (TLRs). Esses receptores reconhecem o LPS bacteriano como estranho ao hospedeiro, de forma única e específica para cada bactéria (Baron, 1996).

A resposta imunológica mais conhecida e estudada é a promovida pelas toxinas da *Escherichia coli*, uma enterobactéria que é utilizada para descrever como o LPS participa da resposta imune (Baron, 1996).

As proteínas circulantes se ligam à porção da lipíde A das endotoxinas e nesse complexo se liga aos receptores de membrana CD14 dos macrófagos, estimulando as funções dos receptores toll (TLR). Sabe-se que há mais de dez diferentes tipos de TL receptores e alguns deles estão envolvidos no reconhecimento de compostos bacterianos. O TLR4 é o que participa desse processo, respondendo à presença do LPS. O TLR4 faz com que o macrófago sintetize mediadores químicos, denominados citocinas. Neste processo há produção de interleucina-1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e fator de agregação plaquetária (PAF). As citocinas, por sua vez, se ligam aos receptores de citocinas presentes nas células de macrófagos, linfócitos T, fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e osteoblastos. Além disso, ativam o sistema de fixação de complemento e as vias de coagulação. Podem ainda ligar-se diretamente às moléculas TLR-4. A excessiva produção desses fatores pode levar à síndrome respiratória aguda

(ARDS), à coagulação intravascular disseminada (DIC) e por fim à falência múltipla dos órgãos (MOSF) (Slofstra *et al.*, 2003, Figura 3). Na maioria dos casos em que ocorre DIC há alto risco de óbito, muitas vezes, só se descobre a causa da morte por meio de autópsia. Slofstra *et al.* (2003) estudaram a patofisiologia da coagulação intravascular disseminada (DIC), que pode ser provocada pela reação de Shwartzman generalizada ou por mecanismos moleculares. Neste último caso a DIC acontece pelo mecanismos normais de coagulação e processo fibrinolítico endógeno. Já a reação de Shwartzman generalizada consiste no acúmulo de microtrombos, presença de hemorragias, agregação plaquetária, oclusão vascular, inibição a fibrólise, acumulação de neutrófilos, injúria endotelial e finalmente graus de apoptoses e necroses mio-vasculares (Slofstra *et al.*, 2003).

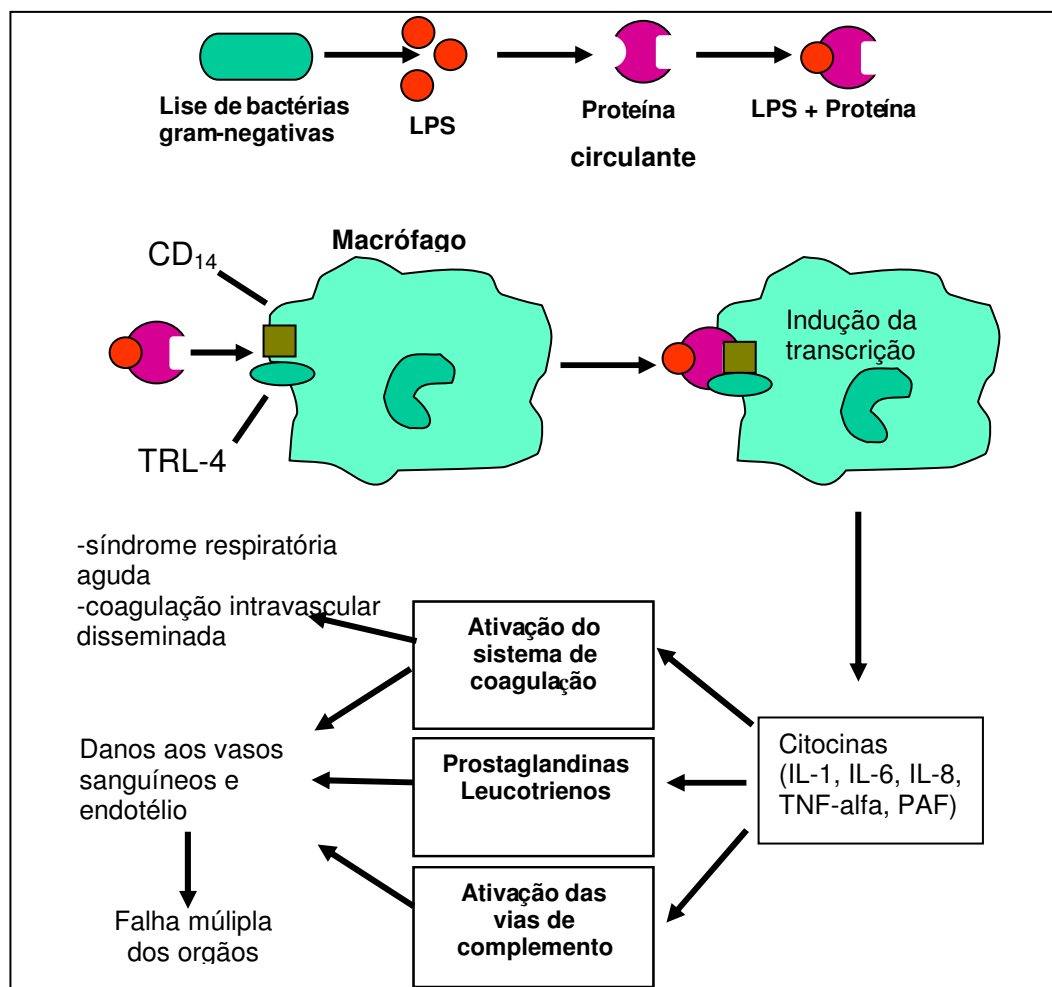


Figura 3. Participação do LPS na resposta imune clássica

Entretanto, os LPSs das bactérias Gram-negativas da cavidade bucal parecem não ser capazes de desencadear uma reação inflamatória tão severa quanto à provocada por enterobactérias. Bartuff *et al.* (2005) avaliaram o papel das vesículas externas da membrana (OMV) liberadas por *P. gingivalis* sobre o crescimento de fibroblastos e células endoteliais pelo método de cultura de células. Eles verificaram que há uma diminuição no crescimento de células de fibroblastos e também células endoteliais devido à presença de OMV. Entretanto atribuíram esse fato à proteínas presentes na OMV e não à endotoxinas. Para diferenciar o papel das proteínas do LPS os autores utilizaram uma elevação na temperatura á níveis de degradação protéica como marcador, assim provaram ser elas as maiores responsáveis pela diminuição no crescimento de fibroblastos. Concluíram que as vesículas externas da membrana (OMV) contribuem para a periodontite crônica devido a supressão da proliferação celular e revascularização dos tecidos periodontais.

Estudos têm sido realizados em endodontia com a finalidade de entender o papel do LPS bacteriano nas lesões periapicais e encontrar métodos para neutralizar seus efeitos tóxicos. Trabalhos esses utilizaram modelos *in vitro* ou modelos *in vivo* em animais. Até o momento, poucos estudos (Schein & Schilder, 1975; Kahabbaz *et al.*, 2000, 2001; Jacinto *et al.*, 2005) relatam a quantificação de endotoxinas em polpas dentais humanas, entretanto nenhum deles verificou se houve ou não redução das quantidades de LSP após os procedimentos endodônticos.

O hipoclorito de sódio foi estudado *in vitro* na detoxificação de endotoxinas provenientes da *Escherichia coli* e da *Salmonella* spp. A avaliação foi realizada após o contato das endotoxinas com as soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações 0,58%, 2,7% e 5,2%. Os resultados revelaram que todas as concentrações foram efetivas na completa detoxificação das endotoxinas estudadas (Butter & Crawford, 1982).

Safavi & Nichols (1993) avaliaram *in vitro* o efeito do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano. Para tal, ácidos graxos livres foram quantificados em

amostras de LPS. O hidróxido de cálcio mostrou liberar quantidades elevadas de ácidos graxos. Esses resultados sugeriram que o hidróxido de cálcio promove uma degradação do LPS e seus efeitos podem ser benéficos para o uso clínico em Endodontia.

Barthel *et al.* (1997) avaliaram *in vitro* a liberação do fator tumoral alfa (TNF-alfa) após a exposição do LPS da *E. coli* ao hidróxido de cálcio. O objetivo deste trabalho foi investigar se o LPS poderia ser neutralizado pelo uso do hidróxido de cálcio. Quatro concentrações de LPS de *E. coli* variando entre 1 e 100 ng/ml foram diluídas em águas estéreis e incubadas em contato com 25 mg de hidróxido de cálcio ou incubadas em apenas água. Monócitos foram coletados de sangue periférico, centrifugados e as densidades padronizadas. Os monócitos foram incubados por 4 dias a 37°C em 5% de CO₂ no meio M199 contendo 10% de soro autógeno. As diferentes soluções de LPS foram colocadas, no quinto dia, em contato com os monócitos. Após 4 horas o supernadante foi coletado e o TNF-alfa quantificado pelo método ELISA. Os resultados indicaram que o hidróxido de cálcio foi capaz de eliminar a capacidade do LPS de estimular TNF-alfa.

Khabbaz *et al.* (2000, 2001) investigaram a presença ou ausência de endotoxinas em lesões de cáries e polpas de dentes com lesão de cárie, quantificaram as endotoxinas presentes, e associaram sua presença ou ausência com dor pulpar aguda. As amostras foram coletadas de 28 dentes com lesão de cárie (15 sintomáticos, 13 sem sintomatologia). Amostras também foram coletadas de 5 dentes sem cárie dental. Durante os procedimentos de coleta as polpas foram pesadas e padronizadas (aproximadamente 8 mg). A extração da endotoxina foi realizada com fenol e água. As quantidades de endotoxinas foram determinadas pelo teste LAL. Os resultados mostraram que as polpas dos dentes com sintomatologia dolorosa foram em média 0,15773 ng/mL; os sem sintomatologia, 0,10723 ng/mL e os sem lesão de cárie estavam livres de endotoxinas. A presença de endotoxinas foi significativamente maior no grupo de dentes com sintomatologia. A presença de endotoxinas nos tecidos periapicais de dentes com lesão de cárie indicam que elas podem desempenhar um papel

importante nas doenças pulpares humanas, visto que há uma quantidade maior de endotoxinas nas polpas com sintomatologia dolorosa.

Wang *et al.* (2001) avaliaram *in vitro* por intermédio do método de cultura de células as alterações imunológicas promovidas no LPS devido ao tratamento com hidróxido de cálcio. Uma quantidade de TNF-alfa liberada por estimulação de células foi utilizada como marcador das propriedades imunológicas do LPS e como padrão para avaliar alterações provocadas pelo uso do hidróxido de cálcio. Dentro da concentração de LPS observada (10 µg/L-10 mg/ml), as propriedades imunológicas originais do LPS diminuíram significativamente após o tratamento com hidróxido de cálcio por uma semana. Em pH de 12,30 ou mais elevado as quantidades de TNF-alfa excretadas por monócitos não se diferenciou do grupo controle. Os autores concluíram que após o tratamento com hidróxido de cálcio por uma semana as propriedades originais do LPS diminuíram. O elevado pH do hidróxido de cálcio desempenha um papel crítico durante as alterações imunológicas das propriedades do LPS.

Buck *et al.* (2001) avaliaram *in vitro* os efeitos dos irrigantes endodônticos e do hidróxido de cálcio nos lipopolissacarídeos pela técnica de espectrofotometria de massa e gás cromatográfico. Soluções aquosas de LPS foram misturadas aos irrigantes endodônticos por 30 minutos e ao hidróxido de cálcio por 5 dias. A inativação do LPS foi medida pela quantificação de ácidos graxos liberados. A água, EDTA, etanol, clorexidina 0,12% na forma líquida, clorexidina + hipoclorito de sódio e o hipoclorito de sódio sozinho mostraram uma pequena ação no LPS. A aplicação do hidróxido de cálcio por 5 dias e 30 min, assim como a exposição a uma mistura alcalina da clorexidina, etanol e hipoclorito de sódio apresentaram ação no LPS.

Nelson-Filho *et al.* (2002) investigaram *in vivo* radiograficamente a região apical e periapical de dentes de cães contendo LPS de *E. coli*. Após a remoção da polpa de 60 pré-molares, estes foram divididos em grupos, sendo que no grupo 1 foram preenchidos com endotoxina bacteriana, grupo 2 com endotoxina e hidróxido de cálcio, grupo 3 com solução salina e grupo 4 as lesões periapicais

foram induzidas sem colocação de de endotoxina e nem hidróxido de cálcio. Após 30 dias foram observadas lesões periapicais similares nos grupos 1 e 4. A lâmina dura estava intacta nos grupos 2 e 3. As endotoxinas bacterianas causaram lesões periapicais visíveis radiograficamente, mas a associação de hidróxido de cálcio neutralizou a ação da endotoxina.

Tanomaru *et al.* (2003) utilizaram dentes de cães contendo LPS bacteriano para avaliar o efeito do preparo biomecânico com diferentes soluções irrigadoras e da medicação intracanal de hidróxido de cálcio. Cento e quarenta raízes de pré-molares de 7 cachorros foram preenchidas com endotoxina de *E. coli* por 10 dias (3 canais foram perdidos durante os procedimentos histológicos). As seguintes soluções irrigadoras foram utilizadas para o preparo biomecânico: hipoclorito de sódio 1% (grupo 1, n=20), 2,5% (grupo 2, n=19), 5%(grupo 3, n= 19), clorexidina aquosa 2% (grupo 4, n=20) e solução fisiológica (grupo 5, n= 19). No grupo 6 foi mantido o LPS no canal radicular durante todo o experimento (n=20), o grupo 7 foi preenchido com hidróxido de cálcio (Calen) após o preparo mecânico com o emprego de solução salina. Após 60 dias, os animais foram sacrificados e os seguintes parâmetros foram avaliados: a) infiltrado inflamatório, b) espessamento do ligamento periodontal, c) reabsorção de cimento e d) reabsorção óssea. Os resultados histopatológicos revelaram que os grupos 1 e 6 tiveram os maiores infiltrados inflamatórios, maiores espessamentos do ligamento periodontal e maior perda de cimento e osso em comparação com o grupo 7, o qual continha a medicação de hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que o preparo biomecânico com as soluções irrigadoras não inativaram os efeitos da endotoxina, mas a medicação intracanal pareceu inativar *in vivo* em dentes de cães os efeitos do LPS.

Silva *et al.* (2004) preencheram 120 canais de 6 cães com LPS após a pulpectomia e avaliaram histologicamente a efetividade da preparação mecânica usando diferentes soluções irrigadoras. As soluções irrigadoras usadas foram: solução salina, hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5% e clorexidina 2%. Nenhum irrigante foi utilizado no grupo controle. Os animais foram sacrificados após 60

dias, os dentes fixados e desmineralizados. Subseqüentemente, foram realizados cortes seriados e coloridos pela técnica Brown-Brenn para verificação de contaminação microbiana. As amostras mostraram que o infiltrado inflamatório foi menos intenso nos grupos que continham hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 2%. Entretanto, nenhum dos irrigantes inativou completamente o efeito maléfico do LPS. O preparo químico-mecânico associado a diferentes soluções irrigadoras não inativaram o LPS.

Hong *et al.* (2004) investigaram a ação do LPS nos tecidos periapicais com relação à indução de reabsorção óssea. Polimixina B foi avaliada no tratamento das lesões periapicais. O LPS foi isolado de dois comuns endodonto-patógenos, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas endodontalis*, o LPS foi inserido em macrófagos de ratos para liberar interleucina 1 alfa (IL-1 alfa) e o fator de necrose tumoral (TNF-alfa). Os resultados mostraram uma relação do LPS com o aumento da estimulação. A polimixina B inibiu significativamente esses efeitos. O LPS também estimulou a expressão gênica da matriz de metaloproteinase 1 (MM-1). Os anticorpos anti IL-alfa e TNF-alfa diminuíram seus efeitos. A administração de polimexina B reduziu as extensões das lesões de reabsorção óssea e simultaneamente o número do fator produtor de macrófagos MMP-1. Os autores concluíram que a liberação de LPS dos canais radiculares infectados estimula a síntese de IL-1 alfa e TNF-alfa de macrófagos. Estas citocinas pré-inflamatórias regulam a produção de MMP-1 pelos macrófagos, as quais induzem reabsorções periapicais.

Oliveira *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* o efeito dos medicamentos intracanaís em endotoxinas no interior de canais radiculares. Setenta e cinco dentes recém extraídos foram utilizados neste estudo. As coroas dos dentes foram cortadas próximas à junção cimento-esmalte para padronizar os comprimentos dos canais em 14 mm. Os canais foram instrumentados com porção apical correspondente a lima #50 e preenchidos com hipoclorito de sódio 1%. Posteriormente, esses dentes foram estilizados com irradiação gama. Solução estandardizada de endotoxina de *E. coli* foi inoculada em 60 canais. Os espécimes

foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de acordo com o medicamento intracanal usado: (G1) hidróxido de cálcio, (G2) polimixina B, (G3) neomicina – polimixinaB - hidrocortizona combinados, (G4) controle positivo (sem medicação intracanal), (G5) controle negativo (sem endotoxina no interior dos canais). Após 7 dias, a neutralização da endotoxina foi avaliada pelo teste Limulus Lysate (LAL) e a produção de anticorpos em culturas de linfócitos B. Os resultados mostraram que os grupos 1, 2 e 5 apresentaram os melhores resultados para o teste LAL comparados aos grupos 3 e 4. A estimulação da produção de anticorpos em culturas foi menor para os grupos 1 e 6 do que a dos grupos 2, 3, 4 e 5. Os grupos 2 e 5 induziram um pequeno aumento na produção de anticorpos em relação aos grupos 1 e 6. Os grupos 3 e 4 induziram um aumento significativo na produção de anticorpos. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio e a polimexina B utilizados como medicamentos intracanaís neutralizaram as propriedades do LPS estimular a produção de anticorpos dos linfócitos-B. A combinação de neomicina - polimixina B - hidrocortisona não neutralizou as ações da endotoxina.

Jacinto *et al.* (2005) investigaram as quantidades de endotoxinas em dentes com polpa necrosada e as possíveis interações entre a quantidade de endotoxinas e a presença ou ausência de sinais e sintomas. As amostras foram coletadas de 50 canais radiculares que necessitavam de tratamento endodôntico devido à necrose pulpar. A quantidade de endotoxinas foi mensurada pelo teste LAL. As quantidades de endotoxinas presentes nas amostras variaram de 2.390 a 22.100 EU/mL. O valor médio da concentração de endotoxinas de pacientes com dor espontânea foi 18.540 UE/mL, enquanto que os casos sem sintomatologia apresentaram valor médio de 12.030 UE/mL. Foram encontradas associações positivas entre a quantidade de endotoxinas e a sintomatologia. Os autores concluíram que a presença de grande quantidade de endotoxinas estava relacionada à presença de sintomatologia.

2.2. MEDICAMENTOS DE USO LOCAL E SISTÊMICOS NO COMBATE À INFECÇÃO ENDODÔNTICA

2.2.1. MEDICAMENTOS DE USO LOCAL EM ENDODONTIA

Para promover a desinfecção do sistema de canais radiculares, rompendo o equilíbrio do ecossistema microbiano, são utilizadas substâncias com propriedades químicas com ação local, como as substâncias auxiliares ao preparo-mecânico dos canais radiculares ou os medicamentos intracanaís utilizados nos intervalos entre sessões de atendimento.

2.2.1.1. SUBSTÂNCIAS AUXILIARES DO PREPARO QUÍMICO MECÂNICO

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover completa desinfecção de algumas áreas devido às complexidades anatômicas dos canais (Byström *et al.*, 1985). Para tanto, é importante ressaltar a necessidade da utilização de substâncias químicas auxiliares com o intuito de promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, uma vez que, auxiliarão na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosado e pré-dentina (Spangberg, 1982; Byström & Sundqvist 1983). Algumas substâncias químicas têm sido utilizadas com estes objetivos. Dentre elas o hipoclorito de sódio (NaOCl), clorexidina, EDTA e ácido cítrico se destacam.

À partir da introdução do hipoclorito de sódio (NaOCl) como solução irrigadora em Endodontia (Walker 1936), esta substância química vem sendo amplamente utilizada. Sua ação antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2001, Ferraz *et al.*, 2001, Vianna *et al.*, 2004) e dissolução tecidual (Beltz *et al.*, 2003, Naenni *et al.*, 2004) têm sido demonstradas em vários estudos. O NaOCl é conhecido por sua

atividade antimicrobiana frente aos microrganismos encontrados no interior do sistema de canais radiculares (Byström & Sundqvist, 1983; Foley *et al.*, 1983; Hauman & Love, 2003; Berber *et al.*, 2006). A ação antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio ocorre devido ao seu equilíbrio dinâmico, demonstrado na seguinte reação química: $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NaOH} + \text{HOCl} \leftrightarrow \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{OCl}^-$

O NaOCl (hipoclorito de sódio, sal) reage com molécula de água (H_2O) formando NaOH (hidróxido de sódio, base forte) e HOCl (ácido hipocloroso, ácido fraco). O hidróxido de sódio atua como solvente orgânico e de gordura, formando sabão (reação de saponificação). O ácido hipocloroso possui efeito antimicrobiano por liberar cloro nascente, que se liga ao grupamento NH_2 dos aminoácidos, formando as cloraminas, interferindo no metabolismo celular. Além disso, inibe a função enzimática bacteriana por oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002). Entretanto, a toxicidade do NaOCl é diretamente proporcional à concentração (Becking, 1991; Hülsmann & Hahn, 2000; Tanomaru Filho *et al.*, 2002). A literatura relata casos de injeções acidentais deste irrigante nos tecidos periapicais (Becking, 1991; Kaufman & Keila, 1989), causando várias complicações aos tecidos. Tais acidentes são de relevância clínica por poderem gerar dor severa, rápido desenvolvimento de edema, hematoma, necrose e abscessos. Gernhardt *et al.* (2004) demonstraram por intermédio de um caso clínico os efeitos lesivos aos tecidos moles proporcionados pela irrigação endodôntica com NaOCl e sugerem precauções na sua utilização.

A clorexidina tem sido recomendada como uma substância irrigadora alternativa ao NaOCl devido a sua biocompatibilidade (Jeansonne & White, 1994). Seu uso tem sido proposto na forma de sal digluconato, líquido ou gel, em diferentes concentrações tanto como agente irrigante dos canais radiculares (Delany *et al.*, 1982; Greenstein, *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986; Jeansonne & White, 1994; Ferraz, 1999; Leonardo *et al.*, 1999; Vianna *et al.*, 2004) quanto

como medicação intracanal (Delany *et al.*, 1982; Heling *et al.*, 1992 b; Siqueira & Uzeda, 1997; Vianna, 2002; Gomes *et al.*, 2006).

A clorexidina possui: a) ação antimicrobiana imediata; b) um amplo espectro antibacteriano sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos (Hennessey, 1973; Greenstein, *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986, Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005), especialmente *Candida albicans* (Waltimo *et al.*, 1999); c) relativa ausência de toxicidade (Greenstein *et al.*, 1986); d) capacidade de adsorção pela dentina e lenta liberação da substância ativa, o que prolonga sua atividade antimicrobiana residual (Heling *et al.*, 1992; Jeansonne & White, 1994; White *et al.*, 1997).

A clorexidina é uma base anti-séptica forte e é mais estável na forma de sal (gluconato, acetato ou hidrocloreto). Para uso oral é preparada na forma de digluconato em diferentes concentrações, por possuir alta solubilidade em água e, quando em pH fisiológico, dissociar-se e interagir com a hidroxiapatita, película adquirida, glicoproteínas salivares, superfície de mucosas e às paredes celulares das bactérias (Greenstein, *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986).

Hennessey (1973) relata que a interação da clorexidina com as células bacterianas ocorre devido a: a) aderência à parede celular; b) alteração da permeabilidade da membrana celular; c) precipitação e coagulação do conteúdo citoplasmático.

Esta ação ocorre devido à aderência das moléculas catiônicas de clorexidina às paredes celulares dos microrganismos, que são carregadas negativamente, alterando a permeabilidade da membrana celular, o que resulta na perda dos componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico da célula. Em baixa concentração a clorexidina promove a saída das substâncias de baixo peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo assim o efeito bacteriostático. Em alta concentração promove o efeito bactericida, pela precipitação ou coagulação do conteúdo citoplasmático, resultando na morte celular (Fardal &

Turnbull, 1986). O efeito bacteriostático da clorexidina é considerado o mais importante porque a ligação da molécula de clorexidina é liberada lentamente em baixas quantidades (Fardal & Turnbull, 1986).

Diversos estudos têm demonstrado que a clorexidina inibe o crescimento de bactérias encontradas nas infecções endodônticas (Cervone *et al.*, 1990; Siqueira & Uzeda, 1997; Ferraz, 1999, Vianna *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2006), possui ação antimicrobiana residual, resultante de sua lenta liberação, 48 a 72 horas (White *et al.*, 1997; Leonardo *et al.*, 1999) ou até 7 dias (Dametto *et al.*, 2005) após a instrumentação do canal radicular. Além da ação residual possui relativa ausência de citotoxicidade (Jeansonne & White, 1994).

Duas formulações têm sido propostas para o uso da clorexidina, a líquida e a gel. Alguns estudos mostram que a atividade antimicrobiana da clorexidina líquida é igual ou superior a da gel quando o contato direto é utilizado como metodologia (Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004). Em contrapartida, a clorexidina gel facilita a instrumentação, lubrificando a luz do canal radicular, o que diminui o atrito entre parede e instrumento podendo reduzir, assim, a ocorrência de fraturas de instrumentos no interior do sistema de canais radiculares (Berber 2005). Além de que, ao facilitar a instrumentação, a clorexidina gel termina por melhorar a capacidade dos instrumentos em eliminar tecidos orgânicos, o que compensa sua incapacidade de dissolvê-lo (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2001). Outra vantagem da clorexidina gel sobre a líquida seria a diminuição da formação de *smear layer* (Ferraz *et al.*, 2001), o que não acontece com a líquida.

2.2.1.1.1. ESTUDOS DE REDUÇÃO MICROBIANA *IN VITRO*

Shih *et al.* (1970) avaliaram *in vitro* a ação bactericida da solução de hipoclorito de sódio 5,25% empregando teste de diluição. Observaram que a solução de hipoclorito de sódio é um potente bactericida e que promoveu a desinfecção em 100% dos canais radiculares inoculados com “*Streptococcus*

faecalis" e *Staphylococcus aureus*. Porém, culturas realizadas de dois a sete dias após o preparo biomecânico revelaram elevado índice de recontaminação dos canais radiculares. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 5,25% é altamente bactericida, no entanto, não permite a esterilização completa do sistema de canais radiculares.

Siqueira *et al.* (1999) avaliaram *in vitro* a redução da população microbiana de canais radiculares antes e após o preparo mecânico. Os canais foram infectados com *Enterococcus faecalis* e instrumentados manualmente com limas Nitiflex, GT e Profile 0,06 (série 29, rotatória). A irrigação foi realizada com solução salina. Os autores verificaram que todas as técnicas foram capazes de reduzir mais de 90% o número de microrganismos do interior dos canais radiculares.

Dametto (2002) teve como proposta avaliar e comparar *in vitro* a atividade antibacteriana da clorexidina gel 2% frente a *Enterococcus faecalis* em relação a outros irrigantes (clorexidina líquida 2% e hipoclorito de sódio 5,25%). Para tal avaliação, raízes de pré-molares inferiores humanos foram preparadas por instrumentação seriada, autoclavadas e contaminadas por um período de 7 dias com monoculturas de *Enterococcus faecalis*. Em seguida os dentes foram divididos em 5 grupos e submetidos ao preparo químico-mecânico com variação apenas da substância química auxiliar. Para se avaliar o potencial antimicrobiano das substâncias químicas auxiliares, foram realizadas 3 coletas bacteriológicas denominadas: pré-tratamento (coleta antes do preparo químico-mecânico); pós-tratamento (imediatamente após o preparo químico-mecânico) e final (7 dias após o preparo químico-mecânico). Uma vez obtidas as coletas, estas foram cultivadas a fim de se determinar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), sendo então os resultados analisados estatisticamente. O gluconato de clorexidina 2,0% tanto na forma gel quanto líquida promoveram uma redução significativa nas coletas imediata e 7 dias após. Já o hipoclorito de sódio 5,25% apenas reduziu UFC na coleta imediatamente após o PQM, constatando crescimento bacteriano na coleta final. Conclui-se que, dentre os meios químicos auxiliares testados como

irrigante endodôntico, o gluconato de clorexidina 2%, gel e líquida, foram mais efetivos que o NaOCl 5,25% sobre o *E. faecalis*.

Colero *et al.* (2002) compararam a redução microbiana dos canais radiculares após a utilização de instrumentos rotatórios com e sem alargamento apical. Trinta e oito raízes palatinas de molares superiores com ápices formados foram utilizados. As raízes foram esterilizadas e contaminadas com *E. faecalis*. Os dentes foram preparados pela técnica step-down com limas rotatórias GT a 350 rpm e irrigados com NaOCl e EDTA. Os resultados mostraram que no grupo em que se utilizou alargamento apical 94% dos canais ficaram livres de microrganismos, enquanto que o grupo que não sofreu alargamento apenas 81% dos canais estavam livres de microrganismos, entretanto não houve diferença estatística entre grupos. Os autores concluíram que pode não ser necessário o alargamento apical quando uma conicidade adequada na coroa é alcançada, permitindo uma irrigação eficiente dos agentes antimicrobianos através do sistema de canais radiculares.

Siqueira *et al.* (2002) avaliaram *in vitro* a redução microbiana nos canais radiculares instrumentados pela técnica manual com limas de níquel titânio irrigadas com NaOCl 2,5% seguido de ácido cítrico (G1), limas rotatórias alternadas irrigadas com NaOCl 2,5% e clorexidina líquida 2% (G2) e limas rotatórias GT irrigadas com NaOCl 2,5%. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e as unidades formadoras de colônia (UFC) contadas. Todas as técnicas utilizadas promoveram redução microbiana similar nos canais radiculares. Os autores concluíram que é importante utilizar uma solução irrigadora com potencial antimicrobiano durante o preparo químico-mecânico independentemente da técnica empregada.

Berber (2005) avaliou *in vitro* o uso de substâncias químicas auxiliares do preparo mecânico (clorexidina; CLX) gel e líquida 2%, hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25%, 2,5% e 0,5% e soro fisiológico e técnicas de instrumentação Híbrida; Cérvico-Apical (FOP-UNICAMP); instrumentação rotatória com HERO 642 na redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários.

Foram utilizadas 270 raízes de pré-molares inferiores contaminadas com *Enterococcus faecalis*, divididas em 18 grupos nos quais as técnicas de instrumentação foram testadas variando o uso das substâncias químicas auxiliares. Amostras bacteriológicas do canal radicular foram coletadas antes e imediatamente após o preparo químico-mecânico, as UFC contadas. Além disso, amostras de dentina foram removidas dos terços apical, médio e cervical. Na luz do canal radicular, todas as substâncias, inclusive o soro fisiológico quando associados à instrumentação mecânica, promoveram uma redução de quase 100% nas coletas microbiológicas imediatamente após o preparo químico-mecânico. Nas coletas resultantes das raspas de dentina, em todos os terços, técnicas e profundidades o NaOCl 5,25% e a CLX gel 2% obtiveram os melhores resultados na redução bacteriana dos túbulos dentinários seguidos do NaOCl 2,5%, CLX líquida 2% e NaOCl 0,5%. Concluiu-se que, o NaOCl 5,25% a CLX gel 2% com as técnicas Cérvido-Apical da FOP-UNICAMP e HERO, foram mais efetivos na eliminação do *E.faecalis* dos túbulos dentinários e do canal radicular.

Colak *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* a redução da população microbiana dos canais radiculares por meio do preparo mecânico com três diferentes técnicas. Os canais foram contaminados com *Enterococcus faecalis* e instrumentados por instrumentação manual com limas Hedstroen, limas rotatórias Giromatic e Hero 642. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e UFC contadas. Todas as técnicas de instrumentação foram igualmente capazes de reduzir significativamente os microrganismos dos canais radiculares.

Berber *et al.* (2006) avaliaram *in vitro* o uso de NaOCl 5,25%, 2,5% e 0,5% e soro fisiológico e técnicas de instrumentação (Híbrida; Cérvido-Apical (FOP-UNICAMP); instrumentação rotatória com HERO 642 na redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários. Foram utilizadas 180 raízes de pré-molares inferiores contaminadas com *Enterococcus faecalis*, divididas em grupos, nos quais as técnicas de instrumentação foram testadas variando o uso diversas concentrações de NaOCl. Amostras bacteriológicas do canal radicular foram coletadas antes e imediatamente após o preparo químico-mecânico e

também por remoção de dentina dos terços apical, médio e cervical. Nos três terços e em todas as técnicas utilizadas o NaOCl a 5,25% mostrou-se mais efetivo na redução microbiana dos túbulos dentinários seguido da concentração 2,5%. Os autores concluíram que o NaOCl especialmente nas mais altas concentrações, independentemente da técnica de instrumentação utilizada, foi capaz de eliminar o *E. faecalis* dos túbulos dentinários.

2.2.1.1.2. ESTUDOS DE REDUÇÃO MICROBIANA *IN VIVO*

O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 0,5%, como solução irrigadora de canais radiculares, foi avaliado por Byström & Sundqvist (1983). O preparo biomecânico foi realizado em 30 dentes unirradiculares, apresentando coroa intacta, necrose pulpar e lesão periapical. Todas as amostras bacteriológicas iniciais colhidas dos canais radiculares evidenciaram crescimento bacteriano, sendo isoladas 169 espécies bacterianas, com 80% de incidência de anaeróbios. Na maioria das culturas houve mais de uma espécie por amostra, em média de 4 espécies por canal radicular, sendo *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides* os gêneros mais freqüentemente isolados. Foi realizado um total de 4 preparos biomecânicos, com intervalos de 2 a 4 dias, obtendo-se a cada sessão uma coleta bacteriológica. Após o tempo pré-estabelecido, foram feitos testes bacteriológicos dos canais. Os resultados evidenciaram culturas negativas em 12 dos 15 espécimes tratados com hipoclorito de sódio a 0,5% e 8 dos 15 tratados com soro fisiológico. Os resultados sugerem melhor efetividade da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% como irrigante de canais em comparação ao soro fisiológico.

Da mesma forma Byström & Sundqvist, em 1987, avaliaram *in vivo* a ação antibacteriana após a realização do preparo biomecânico em 31 dentes unirradiculares, portadores de necrose pulpar intacta e lesão periapical visível radiograficamente. O sistema de instrumentação ultra-sônico foi empregado com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% como solução irrigadora. Culturas

bacteriológicas, em anaerobiose, foram realizadas decorridos sete dias da primeira e segunda sessões, apresentando 29% e 22,5% de culturas bacteriológicas positivas, respectivamente.

Gomes *et al.* (1996 b) avaliaram as variações na susceptibilidade da microbiota endodôntica aos procedimentos biomecânicos. Quarenta e dois canais radiculares foram investigados, amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e os microrganismos comparados. Em 15 casos de infecções primárias não foram observadas mudanças na microbiota. Entretanto, nos 27 casos de infecções secundárias houve uma redução no número de *Peptostreptococcus*. Quando os 42 casos foram avaliados conjuntamente houve um declínio no número de anaeróbios, espécies Gram-positivas, especialmente *Peptostreptococcus* após o procedimento biomecânico. Os autores concluíram que algumas espécies foram mais resistentes ao preparo biomecânico.

Leonardo *et al.* (1999) avaliaram *in vivo* a atividade antimicrobiana da solução de clorexidina 2%. Foram utilizados 22 dentes (incisivos e molares) de 12 pacientes. As amostras foram coletadas antes e após 48 horas da instrumentação, nesses período os canais permaneceram vazios, isto é sem medicamento intracanal. Os resultados mostraram que houve uma redução de 100% de *S. mutans* e em geral houve uma redução de 77,78% para microrganismos anaeróbios. Os autores concluíram que a clorexidina previne *in vivo* o crescimento microbiano devido aos seus efeitos residuais até 48 horas após sua utilização.

Shuping *et al.* (2000) avaliaram a redução bacteriana nos canais radiculares após o uso de limas rotatórias de níquel titânio e irrigação com NaOCl 1,25%. A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio utilizado por 7 dias também foi avaliada. Quarenta e dois dentes com periodontite apical crônica foram examinados. As amostras foram coletadas antes e após instrumentação e 7 dias após o uso de medicação. As coletas iniciais mostraram que todos os canais estavam infectados, após instrumentação 61,9% dos casos estavam livres de bactérias e após 7 dias de medicação 92,5% dos casos. Os autores concluíram que a instrumentação rotatória com NaOCl é um passo importante na redução da

microbiota dos canais radiculares, entretanto não foi possível eliminar os microrganismos de todos os canais estudados. A utilização da medicação intracanal por 7 dias poderia ser útil para reduzir ainda mais a microbiota dos canais radiculares.

Peters *et al.* (2002) avaliaram os efeitos da instrumentação, irrigação com hipoclorito de sódio 2,0% e medicação intracanal de dentes com polpas infectadas e com lesões periapicais. Foram coletadas amostras de 43 dentes antes (S1), após o tratamento durante a primeira visita de atendimento (S2), antes (S3) e após tratamento (S4) na segunda visita de atendimento. Na primeira visita os dentes foram instrumentados e divididos em dois grupos, em um grupo os dentes foram obturados (metade dos dentes avaliados) e outro grupo os canais preenchidos com hidróxido de cálcio ou salina. Após 4 semanas os dentes que continham medicação foram acessados novamente e coletados (S3, S4). O número de UFC das amostras diminuíram significativamente no final da primeira sessão de $1,0 \times 10^6$ para $1,0 \times 10^3$, mas houve um aumento no número de UFC para as coletas S3 e S4. Não houve diferenças de UFC entre S2 e S4 (após instrumentação). As espécies mais freqüentemente isoladas foram *P. intermedia*, *Capnocytophaga* spp., *Actinomyces odontolyticus*, *Propionibacterium acnes* e *Propionibacterium micros*. Os autores concluíram que o número de microrganismos aumentou no período entre visitas, apesar do uso hidróxido de cálcio como medicação intracanal por 4 semanas.

Ercan *et al.* (2004) comparam a ação antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras dos canais radiculares em dentes com necrose pulpar e lesões periapicais. Trinta e dois incisivos e pré-molares de 20 pacientes foram utilizados neste estudo. As amostras foram coletadas antes e após o preparo biomecânico. Após a contagem de UFC os autores concluíram que as soluções de hipoclorito de sódio (5,25%) e clorexidina (2%) foram eficazes na redução microbiana em dentes com necrose pulpar e etiologia das doenças periapicais. Ambas as soluções poderiam ser utilizadas como soluções irrigadoras.

McGukin-Smith *et al.* (2005) avaliaram *in vivo* a redução microbiana promovida pela instrumentação com limas Profile GT e irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% e EDTA. O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio também foi avaliado. Trinta e um dentes com periodontite apical foram selecionados. As amostras foram coletadas antes e após instrumentação e após 7 dias de medicação com hidróxido de cálcio. As coletas iniciais mostraram 93,55% dos casos positivos para a presença de microrganismos, após instrumentação 52,72% dos casos e após 7 dias de medicação 14% dos casos. Os autores concluíram que a redução microbiana nos canais radiculares não foi suficiente para deixá-los livres de bactérias e que a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio auxiliou nesse processo de desinfecção dos canais radiculares.

Ferrari *et al.* (2005) avaliaram o efeito dos procedimentos endodônticos em enterococos, bactérias entéricas e fungos em infecções endodônticas primárias. Vinte e cinco dentes unirradiculares com necrose pulpar, câmara pulpar intacta e lesões periapicais foram utilizadas neste estudo. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação. Os resultados mostraram que foram isolados microrganismos em 92% amostras iniciais, destes 22% eram enterococos, enterobactérias ou fungos. Após 7 dias sem a colocação de medicamentos intracanaís, 100% dos canais continham microrganismos, 52% apresentavam uma das três espécies pesquisadas. Entretanto após o emprego de 7 dias de medicamento intracanal (paramonoclorofenol, rinosoro com polietilenoglicol); as enterobactérias e fungos não foram encontradas, entretanto *E. faecalis* foi encontrado. Os autores concluíram que os enterococos, enterobactérias e fungos estão presentes em infecções endodônticas primárias. Enterococos, particularmente *E. faecalis* e *E. faecium* mostraram-se resistentes à remoção por meio do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal.

Vianna *et al.* (2006) avaliaram *in vivo* a redução microbiana após o preparo químico-mecânico em canais radiculares de dentes humanos com polpas necrosadas e lesões periapicais. Foram selecionados 32 dentes unirradiculares,

os quais foram instrumentados com auxílio da clorexidina gel (2%) ou NaOCl (2,5%). A redução microbiana foi avaliada pelo método da reação de polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) utilizando dois diferentes experimentos (SYBRGreen e Taq Man) e a título de comparação a redução microbiana também foi avaliada pelo método tradicional de cultura. Os resultados mostraram que tanto o grupo da clorexidina como o do hipoclorito de sódio foram capazes de reduzir substancialmente a quantidade de microrganismos no interior dos canais radiculares acima de 96%. Entretanto, pelo método da cultura pôde-se verificar que o grupo instrumentado com NaOCl apresentou maior número canais livres de microrganismos (75% dos casos), enquanto que o grupo da clorexidina 50% ainda apresentaram positivos para cultura. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio apresentou maior capacidade de eliminar microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes com infecções primárias.

2.2.1.2. MEDICAMENTOS INTRACANAIS

Vários autores alertaram para a necessidade do emprego de medicação intracanal a fim de impedir que as bactérias sobreviventes ao preparo químico-mecânico se multipliquem no intervalo entre as sessões do tratamento (Byström & Sundqvist 1983; Byström *et al.*, 1985; Sjögren *et al.*, 1990). Além disso, Leonardo *et al.* (2005) defendem o uso de uma medicação intracanal com a finalidade de inativar a porção tóxica do LPS (a lípide A).

Uma medicação intracanal ideal deve ser dotada de boa ação antibacteriana, para que a sua permanência no interior do canal radicular tenha maiores chances de atingir áreas não alcançadas pela instrumentação, como istmos, ramificações, reentrâncias e túbulos dentinários. Dessa forma poderiam contribuir decisivamente para a máxima redução das bactérias que eventualmente ficaram protegidas da ação letal das substâncias químicas irrigantes do canal radicular (Byström *et al.*, 1987; Sjögren *et al.*, 1991).

Várias substâncias antimicrobianas têm sido utilizadas como medicação intracanal, seja para promover a redução microbiana ou a neutralização das endotoxinas. São estas substâncias: soda cáustica (Niwa *et al.*, 1969); polimixina B (otosporin, Oliveira *et al.*, 2005), lisozimas (Ohno & Morrison, 1988), formocresol (Sant'anna *et al.*, 2000), clorexidina (Silva *et al.*, 2004; Tanomaru *et al.*, 2003), hipoclorito de sódio (Oliveira *et al.*, 2005; Poltorak *et al.*, 1998; Tanomaru *et al.*, 2003) e hidróxido de cálcio com várias combinações (Silva *et al.*, 2004, Tanomaru *et al.*, 2003, Oliveira *et al.*, 2005).

2.2.1.2.1. HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

Prováveis mecanismos de ação do hidróxido de cálcio

Dentre os medicamentos intracanaís preconizados destaca-se o hidróxido de cálcio, por possuir atividade antibacteriana pronunciada, devido a sua elevada alcalinidade (Heithersay, 1975; Byström *et al.*, 1985; Safavi *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1999) e por ser recomendado por neutralizar a molécula de Lípide A (Silva *et al.*, 2004, Tanomaru *et al.*, 2003, Oliveira *et al.*, 2005).

O hidróxido de cálcio possui pH entre 12,5 a 12,8, o qual promove a liberação de íons hidroxilas em meio aquoso, elevando o pH do meio. A difusão desses íons no interior dos túbulos dentinários e a permanência por um tempo de contato direto ideal são necessários para que ocorra efetiva destruição dos microrganismos (Chong & Pitt Ford, 1992; Leonardo *et al.*, 2000; Estrela *et al.*, 1995; Estrela *et al.*, 1998). Entretanto, Kontakiotis *et al.* (1995) afirmaram ser possível a redução da microbiota dos canais radiculares infectados, mesmo na ausência de contato físico do medicamento com os microrganismos, graças à absorção do dióxido de carbono produzido pelas bactérias anaeróbias estritas como, *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp. e pelas facultativas *Streptococcus* spp. Esta ação indireta ocorre porque o hidróxido de cálcio se liga ao dióxido de carbono que é essencial para a sobrevivência de alguns microrganismos

facultativos como *Actinomyces* spp., *Eikenella* spp. e *Capnocytophaga* spp.

A baixa solubilidade e difusibilidade do hidróxido de cálcio necessitam de um longo tempo de ação para que o medicamento exerça atividade antimicrobiana nos túbulos dentinários infectados. Embora o tempo ideal necessário para o hidróxido de cálcio descontaminar o sistema de canais radiculares seja ainda desconhecido, sua ação antibacteriana pode ser confirmada clinicamente pela presença de microrganismos resistentes ou ausência de exsudatos nos canais radiculares (Siqueira & Lopes, 1999).

Byström *et al.* (1985) asseguram que o efeito favorável do hidróxido de cálcio ocorre, possivelmente, devido à sua baixa solubilidade, que o faz atuar como um sistema de liberação lenta no interior dos canais radiculares. Pela liberação de íons hidroxilas, mata ou inativa bactérias, promove a obturação física do espaço do canal, bloqueando efetivamente o acúmulo de exsudatos, o que reduz os nutrientes e elimina o espaço para as bactérias se multiplicarem.

O efeito letal dos íons hidroxilas sobre as células bacterianas segundo Siqueira & Lopes (1999) ocorre provavelmente da seguinte maneira: a) destruição da membrana citoplasmática das bactérias; b) desnaturação das proteínas e c) destruição do DNA.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o tipo de veículo associado ao hidróxido de cálcio está diretamente relacionado com a concentração e a velocidade de liberação dos íons OH^- , conseqüentemente com a ação antibacteriana da pasta (Fava & Saunders 1999).

Desta forma, o hidróxido de cálcio é eficaz contra bactérias localizadas no interior dos túbulos dentinários, os íons OH^- difundem pela dentina e alcançam níveis de concentração iônica suficientes para exercer efeito letal sobre os microrganismos. Entretanto, tem sido demonstrado que a hidroxiapatita exerce atividade tampão sobre o hidróxido de cálcio, o que certamente impede a difusão dos íons hidroxilas (Nerwich *et al.*, 1993; Haapalaso *et al.*, 2000).

A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio sobre os microrganismos localizados na intimidade dos túbulos dentinários resulta da difusão dos íons hidroxilas em concentração suficiente para impedir a capacidade de tamponamento da dentina, e assim destruí-los (Siqueira & Lopes 1999).

Estudos que avaliaram pH e difusão de íons do hidróxido de cálcio

Tronstad *et al.* (1980) demonstraram que o pH da dentina radicular de macacos foi elevado, após a utilização de curativos intracanais com pastas de hidróxido de cálcio em veículo aquoso por quatro semanas. Na luz do canal radicular o pH foi superior a 12,2; a dentina adjacente ao canal, em contato direto com o hidróxido de cálcio, apresentou pH variando entre 8,0 e 12,2; e na dentina mais periférica o pH foi de 7,0 a 10,0. O pH do cimento não foi alterado, mantendo-se entre 6,4 a 7,0.

Kehoe (1987) avaliou *in vitro* a reversão do pH ácido da dentina e cimento cervical pós-tratamento clareador em dentes humanos. Utilizou pasta de hidróxido de cálcio em veículo aquoso (pH 12,35) e constatou que ocorreu a alcalinização dos túbulos dentinários após o período de 2, 4 e 11 dias.

Nerwich *et al.* (1993) analisaram *in vitro* a alteração do pH da dentina radicular de dentes humanos extraídos, por um período de quatro semanas após a utilização de pasta de hidróxido de cálcio em veículo aquoso (Calasept®), como medicação intracanal. Observaram a necessidade de 1 a 7 dias para os íons OH^- alcançarem a superfície radicular externa, e após 3 semanas registraram os níveis do pH em 9,3 no terço cervical e 9,0 no terço apical.

Deardorf *et al.* (1994) idealizaram um modelo de estudo experimental em dentes humanos, para avaliar a difusão de íons Ca^{++} nos túbulos dentinários da luz do canal para a periferia radicular externa. A análise da concentração dos íons Ca^{++} no meio extra-radicular revelou que a média em $\mu\text{g/mL}$ variou em função das substâncias utilizadas para aumentar a permeabilidade dentinária. As maiores médias registradas foram para o tratamento com NaOCl 5,25% e as menores

quando foi removido *smear layer* com EDTA 17% e NaOCl 5,25%. Isto ocorreu, provavelmente devido à formação de cristais de fosfato de cálcio, que funcionam como uma barreira física obliterando os túbulos dentinários.

Çalt *et al.* (1999) avaliaram *in vitro* o potencial de difusibilidade de diversos materiais contendo hidróxido de cálcio em canais com defeitos radiculares externos, em períodos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias. Demonstraram que pastas de hidróxido de cálcio liberam Ca^{++} através da dentina radicular, entretanto o pH do meio (solução salina) registrado foi de 7,64, indicando que íons OH^- não se difundiram nos túbulos dentinários.

Schäfer & Behaissi (2000) compararam *in vitro* o efeito alcalinizante de dois curativos intracanaís contendo hidróxido de cálcio após os períodos de 1, 3 e 7 dias. O hidróxido de cálcio em suspensão aquosa demonstrou ser o método de escolha porque promove alcalinização rápida e prolongada tanto da dentina da parede do canal radicular, elevando o pH para 11,2 quanto da superfície radicular externa para pH 9,1 após 24 horas.

Safavi & Nakayama (2000) avaliaram *in vitro* a influência de veículos não aquosos sobre a dissociação do hidróxido de cálcio por meio da mensuração da condutibilidade das soluções. As medidas para o hidróxido de cálcio veiculado em água foi $7,3 \pm 3$ mS/cm. Para o hidróxido de cálcio veiculado em glicerina ou propilenoglicol foi zero, sugerindo que não ocorre a dissociação dos íons OH^- e Ca^{++} , o que impede sua eficácia antimicrobiana como medicação intracanal.

Haapasalo *et al.* (2000) avaliaram a ação de tamponamento da dentina radicular humana utilizando o método do contato direto com alguns medicamentos e relataram que o pó de dentina inativa a ação antibacteriana da solução de hidróxido de cálcio sobre *E. faecalis*. Nas mesmas condições experimentais, a clorexidina 0,05% e 0,5% após 24 horas em contato com o pó de dentina e *E. faecalis* promoveram ação antibacteriana em 99% e 100% dos espécimes, respectivamente.

Pacios *et al.* (2003) avaliaram o pH das pastas de hidróxido de cálcio preparadas com a) água destilada, b) propilenoglicol, c) solução anestésica, d) paramonoclorofenol canforado (CMCP) e propilenoglicol com CMCP. O pH das pastas no interior dos canais radiculares dos pacientes foi medido aos 7, 14 e 21 dias. Os resultados mostraram não haver variação do pH durante os períodos mensurados. A combinação de hidróxido de cálcio com água mostrou maiores valores de pH que as outras pastas. Os valores de pH das pastas preparadas com solução anestésica, CMCP e propilenoglicol com CMCP apresentaram maiores valores *in vitro*. Os autores concluíram que o tipo do veículo utilizado influencia o pH das final das pastas, entretanto a alcalinidade de todas as pastas foi mantida durante o tempo e condições experimentais.

Vianna *et al.* (*in press*) mediram *in vitro* os valores de pH das pastas de hidróxido de cálcio preparadas com diversos veículos em sete diferentes períodos de tempo. As pastas foram manipuladas com: a) água destilada, b) glicerina, c) CMCP, d) CMCP com glicerina, e) anestésico local, f) iodofórmio com água destilada, g) polietilenoglicol, h) CMCP com polietilenoglicol e i) clorexidina gel 2%. Os resultados mostraram que aos 5 min, 1 e 24 h os pHs de todas as pastas variaram de 13,05 a 11,16. Em 48 h e 7 dias os pHs de todas as pastas variaram de 11,66 a 8,92. Aos 14 e 28 dias quase todas as pastas apresentaram valores de pH inferiores a 10. Os autores concluíram que as médias de pH das pastas de hidróxido de cálcio decrescem de acordo com o tempo.

Estudos que avaliaram atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio

Stevens & Grossman (1983) contaminaram dentes caninos de gatos com "*S. faecalis*" e avaliaram a ação antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio e clorofenol canforado durante 5 semanas. Concluíram que o hidróxido de cálcio não foi efetivo para eliminá-los quando comparado ao clorofenol canforado. Para confirmar estes achados realizaram teste de difusão em agar e observaram que o hidróxido de cálcio não produziu zonas de inibição de crescimento bacteriano,

enquanto que o clorofenol canforado produziu largas zonas de inibição.

Byström *et al.* (1985) compararam clinicamente a ação antimicrobiana do PMCC, fenol canforado e pasta de hidróxido de cálcio (Calasept®) em canais com polpas necróticas e lesões periapicais. Demonstraram a eficácia do hidróxido de cálcio em 97% dos casos quando permaneceu no interior do canal por 1 mês, enquanto que o índice de sucesso para o PMCC e o fenol canforado foi de 67%.

Barnett *et al.* (1986) induziram em cães infecções nos canais radiculares pela remoção da polpa e preenchimento dos canais com placa bacteriana dos dentes por 14 dias. Após este período todos os dentes foram instrumentados e medicados com composto quartenário de amônia, formocresol e pasta de hidróxido de cálcio veiculada em solução salina por 14 dias. Os resultados mostraram 90% de culturas negativas para a pasta de hidróxido de cálcio.

Haapasalo & Ørstavik (1987) observaram em um modelo *in vitro* de infecção e desinfecção da dentina radicular bovina, que a pasta à base de hidróxido de cálcio (Calasept®) não eliminou *E. faecalis* no interior dos túbulos dentinários após 10 dias.

Ørstavik & Haapasalo (1990) repetindo o mesmo modelo experimental tornaram a avaliar a ação antibacteriana da pasta Calasept® sobre *E. faecalis* no interior dos túbulos dentinários, com e sem *smear layer*. Após 10 dias de contato constataram sua ineficácia, em ambas as condições experimentais.

Safavi *et al.* (1990) realizaram estudo *in vitro* em dentes humanos infectados com "*Streptococcus faecium*", para avaliar a ação antibacteriana do hidróxido de cálcio misturado com solução salina em consistência de "pasta de dente" e verificaram que as bactérias permaneceram viáveis na dentina após períodos de até 12 horas.

Sjögren *et al.* (1991) avaliaram clinicamente a ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio, Calasept®, em canais radiculares com polpas necróticas e lesões periapicais, por 10 minutos ou 7 dias. Os resultados mostraram total

eliminação dos microrganismos após 7 dias, enquanto que por 10 minutos foi inefetiva.

Estrela *et al.* (1995) também estudaram o efeito antibacteriano *in vitro* de duas pastas de hidróxido de cálcio, uma associada ao soro fisiológico, a outra ao PMCC sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e "*Streptococcus faecalis*". Mostraram pela medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano no agar que as duas pastas foram efetivas após 24 e 48 horas.

Nesta mesma linha de trabalho Siqueira & Uzeda (1996) compararam *in vitro* a ação antibacteriana das pastas de hidróxido de cálcio preparadas com solução salina ou com paramonoclorofenol canforado (PMCC) sobre dentina bovina contaminada com *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* ou *Enterococcus faecalis* nos períodos de 1 hora, 1 dia e 1 semana. Concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio com solução salina foi inefetiva para *E. faecalis* e *F. nucleatum* após 1 semana de contato.

Siqueira & Uzeda (1997) avaliaram a atividade antibacteriana do digluconato de clorexidina gel 0,12%, metronidazol gel 10%, hidróxido de cálcio com água destilada, hidróxido de cálcio com PMCC e hidróxido de cálcio com glicerina sobre bactérias anaeróbias estritas e facultativas comumente encontradas em infecções endodônticas. Foi empregado o teste de difusão em agar e as zonas de inibição bacteriana ao redor de cada medicamento foram registradas e comparadas. Os resultados revelaram que a pasta de hidróxido de cálcio com PMCC e a clorexidina foram efetivas para todos os tipos bacterianos testados (anaeróbios estritos – *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *Actinomyces israelis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes* e *Campylobacter rectus* – e os anaeróbios facultativos – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces viscosus*). O metronidazol inibiu o crescimento de todos os anaeróbios estritos testados e o hidróxido de cálcio com água destilada ou glicerina foram ineficazes.

Tanriverdi *et al.* (1997) compararam *in vitro* a ação antibacteriana do PMCC e do hidróxido de cálcio em dentes humanos infectados com *E. faecalis* e confirmaram por intermédio da análise microbiológica das raspas de dentina a ineficácia do hidróxido de cálcio após períodos de 1 e 3 dias.

Suzuki *et al.* (1999) avaliaram *in vitro* por meio do teste de diluição em agar, a ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio veiculada em água destilada contra 20 espécies bacterianas isoladas de canais radiculares infectados: 12 espécies anaeróbias estritas, *Actinomyces israelii*, *Bifidobacterium bifidum*, *Eubacterium lentum*, *Fusobacterium nucleatum*, "*Peptococcus magnus*", "*Peptococcus niger*", *Peptostreptococcus anaerobius*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella alcalescens* e *Veillonella parvula*; 7 anaeróbias facultativas, *Actinomyces viscosus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* e um fungo (*Candida albicans*). Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (MIC) da pasta de hidróxido de cálcio para todos os microrganismos. Foram incubados por quatro semanas. Os resultados mostraram que a pasta de hidróxido de cálcio apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados.

Estrela *et al.* (1999) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio veiculada em solução salina, em dentes humanos contaminados com "*S. faecalis*", *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Concluíram que foi inefetiva sobre todas as cepas testadas, após um período de 7 dias.

Leonardo *et al.* (2000) avaliaram *in vitro* por meio do teste de difusão em agar a atividade antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio, dentre elas a pasta Calen® sobre algumas cepas bacterianas (*Micrococcus lacteos*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*). Concluíram que esta pasta foi efetiva sobre todas as cepas bacterianas testadas após o período de

24 horas.

Vivacqua-Gomes *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* a presença de *E. faecalis* em dentes extraídos que foram obturados em sessão única ou em múltiplas sessões. Os dentes foram preparados igualmente utilizando CHX gel 2% como substância auxiliar e um grupo com solução salina (controle). A seguir, foram dividido em grupos: a) obturados na mesma sessão, b) receberam medicação com CHX 2% por 14 dias, c) foram irrigados com clorexidina e obturados após 7 dias, d) foram preenchidos com solução salina por 7 dias e e) os dentes do grupo controle foram irrigados com solução salina e obturados imediatamente. Os resultados mostraram que *E. faecalis* não foi eliminado dos túbulos dentinários após 60 dias da obturação em nenhum dos grupos avaliados.

Souza *et al.* (2005) avaliaram o efeito da medicação intracanal na microbiota predominante de canais infectados e com polpas necrosadas pela técnica checkerboard DNA-DNA. A terapia endodôntica convencional com a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio foi realizada em 12 dentes unirradiculares com polpas necrosadas e lesões periapicais. As amostras foram coletadas antes e após 14 dias do uso da medicação, foram investigadas 44 diferentes espécies microbianas. Os resultados mostraram haver uma redução no número de espécies após o uso da medicação, entretanto não elimina todas as espécies encontradas nos canais.

Vianna *et al.* (2006) avaliaram *in vitro* por meio do teste de diluição em caldo a susceptibilidade antimicrobiana de diferentes endodonto patógenos frente ao hidróxido de cálcio combinado a diversos veículos. As pastas foram preparadas com os seguintes veículos: água destilada, glicerina, CMCP, CMCP com glicerina, CMCP com polietilenoglicol. O tempo requerido para as pastas eliminarem o crescimento dos microrganismos anaeróbios e facultativos variou de 6 a 24 horas, enquanto para eliminar os microrganismos anaeróbios estritos variou de 30 segundos a 5 minutos. A susceptibilidade pode ser ordenada dos microrganismos menos suscetíveis aos mais suscetíveis: *E. faecalis* (menos suscetível), *C.*

albicans, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*. Os autores concluíram que a atividade antimicrobiana das pastas de hidróxido de cálcio está relacionada não só a diferentes formulações, mas também à susceptibilidade microbiana.

2.2.1.2.2. CLOREXIDINA (UTILIZADA COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL)

Delany *et al.* (1982) examinaram *in vitro* a ação antimicrobiana da solução de gluconato de clorexidina 0,2% como agente irrigante e medicação intracanal sobre a microbiota do canal radicular de dentes humanos recém-extraídos com polpas necrosadas. A avaliação do crescimento bacteriano foi observada pela inoculação de suspensão de raspas de dentina sobre o agar. Constataram que houve uma redução significativa do número de bactérias em ambos os procedimentos endodônticos.

Heling *et al.* (1992 a) avaliaram *in vitro* o efeito antibacteriano da solução de gluconato de clorexidina aquosa 2,0% e clorexidina 20% em um sistema de liberação lenta (SRD = Slow Release Device), como medicação intracanal em espécimes de incisivos bovinos contaminados com "*S. faecalis*". O sistema de liberação lenta consiste de tiras contendo o glutaraldeído como veículo e 1,2 mg de clorexidina 20% como agente ativo. Este sistema foi diluído em 0,1 mL de solução salina e introduzido no interior do canal. Foi realizada análise microbiológica da dentina removida das paredes do canal e constataram que ambas as formas do medicamento foram efetivas até a profundidade de 0,5 mm nos tempos experimentais de 24, 48 horas e 7 dias.

Heling *et al.* (1992b) compararam a eficácia antibacteriana do gluconato de clorexidina 20% no sistema SRD e do hidróxido de cálcio como medicações intracanaís para a desinfecção dos túbulos dentinários de dentina bovina contaminados com "*S. faecalis*" e prevenção da infecção secundária do sistema de canais radiculares, por meio da turbidez do meio BHI contendo as raspas de dentina. Constataram que a clorexidina foi eficaz tanto para reduzir a população bacteriana da

infecção primária quanto para prevenir a infecção secundária. Ao contrário, o hidróxido de cálcio não mostrou ação antimicrobiana nem para descontaminar a dentina nem para prevenir infecção secundária após 3 e 7 dias.

Barbosa *et al.* (1997) compararam *in vivo* e *in vitro* a atividade antimicrobiana do PMCC, solução de gluconato de clorexidina 0,12% e 0,2% e pasta de hidróxido de cálcio com solução salina em dentes humanos unirradiculares com necrose pulpar e lesão periapical. Os canais radiculares que forneceram culturas positivas uma semana após o preparo químico-mecânico e medicação intracanal com PMCC foram medicados outra vez com uma das três substâncias testadas. Amostras bacterianas pós-medicação foram realizadas uma semana depois. Os resultados mostraram que todos os medicamentos foram efetivos para reduzir ou eliminar a microbiota endodôntica. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada por meio do teste de difusão em agar sobre as bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas (*Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces naeslundii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os tempos experimentais foram 48 h para os aeróbios e anaeróbios facultativos e 7 dias para os anaeróbios estritos. O PMCC e a clorexidina 0,12% e 0,2% foram igualmente efetivos sobre todos os microrganismos e o hidróxido de cálcio foi ineficaz sobre todos os microrganismos, com exceção do *A. israelii* e *A. naeslundii*.

Lindskog *et al.* (1998) avaliaram o efeito terapêutico do gluconato de clorexidina gel 2,0% como medicação intracanal, durante 1 mês, em reabsorções radiculares inflamatórias induzidas em macacos, e concluíram após exame histológico dos espécimes que ocorreu redução do processo de reabsorção, provavelmente devido à sua ação antibacteriana dentro dos túbulos dentinários e sobre as células do ligamento periodontal.

Komorowski *et al.* (2000) avaliaram o efeito antimicrobiano residual da clorexidina em dentina bovina tratada com solução de clorexidina 0,2% durante 5

minutos e 7 dias. A dentina foi submetida à contaminação com *E. faecalis* por 21 dias, após este período, raspas de dentina foram coletadas em BHI para verificação da presença de bactérias nos túbulos dentinários. Constataram potencial antimicrobiano residual como medicação intracanal, quando mantida sobre a dentina por 7 dias.

Lenet *et al.* (2000) seguindo a mesma linha de raciocínio, compararam *in vitro* a atividade antimicrobiana residual da clorexidina gel 2,0%, Clorexidina 25% em um sistema de liberação controlada e hidróxido de cálcio veiculado em solução salina como medicação intracanal em espécimes de incisivos bovinos por 7 dias. Este sistema consiste em uma membrana de polímero degradável imersa em solução salina, a qual libera clorexidina por meio de sua desintegração. Após o período experimental, os espécimes foram inoculados com *E. faecalis* por 21 dias. Foram removidas as raspas de dentina e suspensas em meio BHI para avaliação da atividade antimicrobiana pela turbidez do meio. Constataram que a clorexidina gel 2,0% mostrou ausência de bactérias viáveis em todas as profundidades de dentina.

2.2.1.2.3. HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO À CLOREXIDINA

A proposta da associação entre hidróxido de cálcio e clorexidina possui como justificativa aumentar as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio, mantendo suas características biológicas e mecânicas de barreira física (Gomes *et al.*, 2006). Entretanto, estudos *in vitro* têm demonstrado que algumas substâncias diminuem a efetividade antimicrobiana da clorexidina, quando eventualmente associadas a outras substâncias tais como: cálcio, uréia, lauril sulfato de sódio (Bonesvoll, 1977) e sacarina sódica, nas concentrações 0,5 a 1,0% (Cury *et al.*, 2000).

As propriedades mecânicas dos medicamentos intracanaís foram testadas *in vitro* por Gomes *et al.* (2003 a). Foram utilizados 75 raízes de pré-molares

inferiores divididas nos seguintes grupos: a) medicação com CHX e coroa sem selamento, b) medicamento com hidróxido de cálcio e coroa sem selamento, c) medicamento com CHX e hidróxido de cálcio, coroa sem selamento; os grupos seguintes às coroas foram seladas após a inserção da medicação, d) CHX, e) hidróxido de cálcio, f) associação. O grupo g) controle positivo os dentes permaneceram sem medicamento e sem selamento e o grupo h) controle negativo os dentes estavam íntegros. As coroas ficaram imersas em saliva e BHI e apenas os ápices dos dentes em teste encontravam em contato com o meio de cultura líquido estéril. Os frascos foram incubados e a turbidez do meio observada diariamente. Os resultados revelaram que os tempos médios necessários para a penetração de microrganismos através dos canais contendo os medicamentos variou de 1,8 dias a 17,2 dias. Os medicamentos que apresentaram maior barreira física foram aqueles que continham selamento coronário e dentre estes os melhores em ordem decrescente foram hidróxido de cálcio (grupo e, 17,2 dias), CHX (grupo d, 13,5 dias) e a associação (grupo f, 11,9 dias). Os autores concluíram que o selamento coronário não previne infiltração de microrganismos através dos canais radiculares contendo medicamentos intracanaís.

Com relação à atividade antimicrobiana da associação entre hidróxido de cálcio e CHX, baseados no possível sinergismo entre essa combinação Waltimo *et al.* (1999) avaliaram a ação antifúngica do hidróxido de cálcio, acetato de clorexidina 0,5% e 0,05%, iodine potássio iodado e hipoclorito de sódio, tanto individualmente como em possíveis associações. Discos de papeis absorventes contaminados com *C. albicans* foram colocados em contato com os desinfetantes nos tempos de 30 s, 5 min, 1 h e 24 h pelo método de contato direto. A Clorexidina 0,5% e 0,05% quando comparadas ao hidróxido de cálcio saturado com água destilada foram mais efetivas. Após 24 h, a associação clorexidina 0,5% com hidróxido de cálcio pó também foi mais efetiva que o hidróxido de cálcio saturado com água destilada e menos efetiva que a clorexidina 0,5% sozinha. Concluíram que o hidróxido de cálcio inibiu o efeito antifúngico da clorexidina.

Gomes *et al.* (2002 a) avaliaram *in vitro* a eficácia antimicrobiana da Clorexidina gel 2.0%, do Hidróxido de cálcio (Calen) e da associação de ambos, quando utilizados como medicação intracanal em 120 espécimes de dentina bovina contaminada com *Enterococcus faecalis*. Os espécimes foram infectados por um período de 7 dias, em seguida receberam os medicamentos por intervalos de tempo 1, 2, 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que a clorexidina (CHX) sozinha inibiu o microrganismo testado após 1, 2, 7, 15 dias, entretanto a pasta de Ca(OH)_2 foi ineficaz em todos os períodos estudados. A combinação do Ca(OH)_2 com a CHX foi eficaz após 1 e 2 dias, mas a atividade foi reduzida entre 7 e 15 dias. Os autores concluíram que a CHX gel 2% sozinha foi o medicamento mais efetivo contra *E. faecalis*, mas sua atividade depende por quanto tempo a medicação permanece no canal.

Podbielski *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana da combinação do hidróxido de cálcio com CHX em cones de guta-percha frente a diferentes endodonto-patógenos. O hidróxido de cálcio foi testado em suspensão ou como componente de cones de guta-percha. A eficácia foi comparada com a) suspensão de Ca(OH)_2 , b) cones de guta percha contendo óxido de zinco (ZnO), c) suspensão de Ca(OH)_2 com os cones de guta-percha com ZnO, d) suspensão combinada com CHX e os cones de ZnO, e) suspensão de Ca(OH)_2 com os cones de guta-percha com ZnO/CHX. Os microrganismos testados foram: *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus intermedius*. Os microrganismos foram colocados em contato com as soluções e cones e as amostras coletadas imediatamente, após 1, 2, 4, 7 e 14 dias de incubação. Os resultados mostraram que os microrganismos Gram-negativos foram eliminados com a suspensão de Ca(OH)_2 e a combinação com outros agentes não melhorou as propriedades antimicrobianas da medicação intracanal. A combinação de suspensão de Ca(OH)_2 com os cones de guta-percha com ZnO/CHX (grupo e) eliminou *P. micros* e *S. intermedius* mais rapidamente que a suspensão de Ca(OH)_2 sozinha. Para *E. faecalis*, a combinação de suspensão de Ca(OH)_2 com os cones de guta-percha

com ZnO/CHX (grupo e) diminuiu o crescimento, entretanto não houve completa inativação desse microrganismo. Os autores recomendam o uso da combinação de suspensão de Ca(OH)_2 com os cones de gutta-percha com ZnO/CHX para a erradicação de *P. micros* e *S. intermedius* em canais radiculares infectados.

Siren *et al.* (2004) avaliaram *in vitro* o efeito do hidróxido de cálcio combinado com a clorexidina (CHX) aquosa 2% e o iodeto de potássio (IKI) contra *E. faecalis*. A suplementação do hidróxido de cálcio foi estudada em blocos de dentina bovina e verificaram um melhor desempenho nas associações com CHX e IKI na desinfecção dos túbulos dentinários. Os autores concluíram que essas associações têm potencial para serem utilizadas como medicações intracanaís.

Zerella *et al.* (2005) avaliaram *in vivo* os efeitos da mistura da associação entre hidróxido de cálcio e CHX aquosa 2% comparadas ao hidróxido de cálcio aquoso sozinho na desinfecção do espaço pulpar de dentes com infecções secundárias que apresentavam lesões periapicais. Foram utilizados 40 dentes instrumentados e divididos em dois grupos, a) hidróxido de cálcio e CHX aquosa 2% e b) hidróxido de cálcio aquoso. Foram colocadas as medicações intracanaís por períodos que variaram entre 7 e 10 dias. A presença de enterococos na sessão inicial foi determinada. As culturas dos canais foram coletadas e imersas em tioglicolato. A turbidez do meio foi analisada diariamente por uma semana, então semanalmente até completar 3 semanas. Os resultados mostraram que 12 dos 40 dentes (30%) apresentaram culturas positivas antes da fase de obturação. A medicação controle desinfetou 12 de 20 (60%) dos dentes incluindo 2 de 4 casos que haviam sido diagnosticados enterococos inicialmente. A medicação experimental (associação) desinfetou 16 dos 20 (80%) dos dentes no início da terceira sessão de atendimento. Nenhum dos dentes que continham inicialmente enterococos apresentaram crescimento remanescente. Os autores concluíram que a mistura entre CHX e hidróxido de cálcio foi eficaz na desinfecção de dentes com infecções secundárias.

De Rossi *et al.* (2005) avaliaram *in vivo* o efeito da instrumentação manual com clorexidina aquosa 1% e o uso de medicação intracanal no reparo de lesões periapicais crônicas. Foram induzidas lesões periapicais em dentes de cães e essas lesões foram avaliadas após 30, 75 e 120 dias da instrumentação com limas rotatória e manuais. Dois grupos (grupo II e IV) receberam curativos intracanaís com hidróxido de cálcio e CHX por 15 dias, os grupos I e III não receberam medicações intracanaís. As análises radiográficas aos 120 dias após obturação revelaram que o grupo que recebeu hidróxido de cálcio e CHX como medicação apresentou redução significativa no tamanho das lesões periapicais em comparação com os grupos que foram obturados em sessão única. Os autores concluíram que não importa a técnica utilizada para instrumentar os canais radiculares (manual ou rotatória), o uso da medicação intracanal reduz o tamanho de lesões em canais radiculares infectados de cães.

Gomes *et al.* (2006) investigaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio e associação de ambos frente a vários microrganismos e um fungo possíveis de serem isolados de canais radiculares infectados. Foram utilizados o método da difusão em halo e o método da diluição em caldo. A clorexidina apresentou os maiores halos de inibição variando entre 4,33 e 21,67 mm e sendo necessário um minuto ou menos para eliminar os microrganismos testados. A pasta de hidróxido de cálcio teve ação apenas em contato direto e necessitou de 30 min a 6 horas para inibir o crescimento dos mesmos microrganismos. Já a associação dos dois medicamentos apresentou zonas de inibição variando entre 2,84 e 6,5 mm, sendo necessário de 30 a 60 minutos para inibir o crescimento dos microrganismos testados. Os autores concluíram que a combinação dos dois medicamentos diminuiu a atividade antimicrobiana da clorexidina, entretanto, aumentou a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio.

2.2.2. MEDICAMENTOS DE USO SISTÊMICO EM ENDODONTIA

Os antibióticos são substâncias derivadas ou produzidas por certos microrganismos, substâncias estas que causam danos a outros microrganismos. Alguns antimicrobianos são antibióticos verdadeiros, mas muitos são agentes sintéticos desenvolvidos em laboratório, sendo assim, não são antibióticos no verdadeiro sentido da palavra. O termo “agentes antimicrobianos” abrange mais precisamente todas as drogas ou agentes (isto é, antibióticos e agentes sintéticos) usados contra organismos patogênicos (Schellack 2004; Newman & Kornman, 1997).

Com base na ação biológica, os agentes antimicrobianos podem ser: bacteriostáticos (agentes que inibem o crescimento bacteriano) ou bactericidas (agentes que destroem as bactérias). Quanto ao espectro de ação podem ter pequeno espectro (atingem um grupo de bactérias) ou largo espectro (atingem mais do que um grupo de bactérias) (Schellack 2004).

As drogas antimicrobianas podem possuir toxicidade seletiva absoluta, isto é, causam danos quase que exclusivamente aos microrganismos ou podem apresentar uma toxicidade relativa, ou seja, podem trazer alguns danos ao hospedeiro. A toxicidade absoluta pode ser atingida utilizando as verdadeiras diferenças entre células dos tecidos e aquelas dos microrganismos em questão. Uma das diferenças está na constituição celular. Microrganismos apresentam parede celular e as células membrana plasmática, enquanto que as células humanas só membrana plasmática. Além disso, as bactérias sintetizam seu próprio ácido fólico a partir do ácido p-aminobenzóico (PABA), enquanto que os seres humanos obtêm o ácido fólico dos alimentos (Schellack 2004).

Segundo Newman & Kornman (1997), os agentes antimicrobianos podem atuar com base nos mecanismos de ação: a) sobre a parede celular, b) sobre a membrana celular bacteriana, c) na síntese protéica e d) inibindo a replicação cromossômica.

a) Os antimicrobianos que agem sobre a síntese da parede celular atuam produzindo uma parede com defeitos estruturais atuando sobre o processo de

replicação celular. Neste grupo incluem-se as penicilinas e todos os membros do grupo que possuam anel penicilâmico (amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, benzilpenicina) ou núcleos semelhante a este, como o cefalosporínico (cefalosporinas, vancomicinas, ciclosserinas, bacitracinas e ristocitina).

b) Os antimicrobianos que agem sobre a membrana, funcionam como obstáculo à entrada d'água, lipídios e proteínas carreadores de substâncias necessárias à célula e enzimas importantes ao metabolismo celular. Estes antibióticos intervêm no processo de respiração celular, inibindo a fosforilação oxidativa e causam desorganização da membrana celular. Pertencem a este grupo a polimixina B, nistatina e anfotericina B.

c) Os antimicrobianos que atuam na síntese protéica (tradução) suspendem o crescimento microbiano. Para que haja reprodução bacteriana é indispensável que ocorra, de modo repetitivo, a união de aminoácidos que constituirão as inúmeras moléculas de proteínas microbianas. Estas proteínas microbianas têm função estrutural e enzimática. A bactéria contém, no seu cromossomo, toda a informação genética necessária à produção de enzimas que atuam na síntese de RNA (síntese protéica). Haverá, portanto, detenção do crescimento e eliminação da célula bacteriana. Encontra-se neste grupo o cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos (eritromicina, claritromicina e azitromicina) e clindamicina.

d) os agentes inibidores da replicação cromossômica atuam inibindo a síntese (metabolismo) dos ácidos nucleicos. Podem atuar no DNA dos microrganismos, inibir a síntese do RNA, inibir o ácido tetrahidrofólico, alterar a estrutura dos ácidos nucleicos, ou reduzir a formação de nucleotídeos. Neste grupo incluem-se as quinolonas.

Existem várias “famílias” ou grupos de agentes antimicrobianos disponíveis. Entretanto, apenas alguns dados relevantes dos antimicrobianos utilizados no presente estudo serão abordados.

2.2.2.1. β -LACTÂMICOS

A benzilpenicilina, a amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e o cefaclor pertencem à “ família” dos β -lactâmicos. Os β -lactâmicos apresentam uma estrutura comum de anel β -lactâmico. A estrutura em anel permite que formem ligações covalentes com as assim chamadas proteínas que se ligam á penicilina (PBPs), que agem como enzimas catalíticas (Schellack 2004).

As penicilinas são um grupo de componentes naturais (obtidas a partir do *Penicillium notatum*) e compostos sintéticos com propriedades diferentes de ação bacteriana e propensões semelhantes à alergenidade. Elas tem baixa toxicidade ao hospedeiro, ação bacteriana potente sobre espécies suscetíveis. Embora o mecanismo de ação da penicilina ainda não tenha sido completamente determinado, a sua atividade bactericida inclui a inibição da síntese da parede celular e a ativação do sistema autolítico endógeno das bactérias. A ação da penicilina depende da parede celular que contém na sua composição peptídeoglicano. Durante o processo de replicação bacteriana, a penicilina inibe as enzimas que fazem a ligação entre as cadeias peptídicas, impedindo, portanto, o desenvolvimento da estrutura normal do peptídeoglicano. Estas enzimas (transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase) localizam-se logo abaixo da parede celular e são denominadas de " proteínas ligadoras de penicilina" (*penicillin-binding proteins* – PBPs). A habilidade de penetrar na parede celular e o grau de afinidade destas proteínas com a penicilina determinam a sua atividade antibacteriana. As bactérias, por sua vez, diferem na sua composição quanto ao tipo e à concentração de proteínas ligadoras de penicilina e, conseqüentemente, quanto à permeabilidade de suas paredes celulares ao antibiótico. Assim, temos diferentes susceptibilidades bacterianas à penicilina. Além da ação sobre a parede celular, tem-se considerado a ação da penicilina na ativação do sistema autolítico endógeno da bactéria, determinando a sua lise e conseqüente morte. A principal defesa bacteriana contra esses componentes é a produção de uma enzima chamada β -lactamase, essa enzima abre o anel lactâmico dos antibióticos e suprime sua atividade (Schellack 2004).

A **benzilpenicilina** (Penicilina G) possui absorção deficitária na administração oral, sendo preferida à via parenteral para se obter ação completa. Atua sobre a) Gram-positivos (estreptococos, estafilococos e pneumococos), especificamente os estafilococos que não produzem a penicilinase, ou beta lactamase; b) Gram-negativos (os meningococos, e gonococos); bacilos Gram-positivos (os anaeróbios Gram-positivos, isto é, *Clostridium tetani* e *C. perfringens* e bacilo antraz, porém *C. difficile* é resistente à penicilina) e c) espiroquetas (*Treponema vincentii* e *T. palladium*) (Schellack 2004). A benzilpenicilina é eliminada via renal, possui pico de ação de 20 a 45 minutos, com níveis séricos de 8 µg/ml e com meia vida de 2 h (Newman & Kornman, 1997).

A **amoxicilina** pode ser administrada via oral, intramuscular e endovenosa. Possui o mesmo espectro de ação das benzilpenicilinas, porém estendida para *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Proteus mirabilis* e *E. coli* (Gram-negativos). Apresenta seu pico de ação para uma dose de 800 mg via oral em 1 hora, com níveis séricos de 12 a 14 µg/mL e com meia vida de 1 hora. (Newman & Kornman, 1997).

A combinação da **amoxicilina** com **ácido clavulânico** pertence ao grupo dos beta-lactâmicos, entretanto a adição do ácido clavulânico inibe a ação das beta-lactamases. Pode ser administrado via oral ou injetável. Apresenta espectro de ação similar ao da benzilpenicilina com vantagem adicional de também ser efetivo contra anaeróbios e microrganismos comumente causadores de infecções respiratórias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*. É metabolizado nos rins e apresenta seu pico de ação para uma dose de 500 mg via oral em 2 horas, com níveis séricos de 7 µg/ml e meia vida de 1,5 horas (Newman & Kornman, 1997).

O **cefaclor** é uma cefalosporina de 2ª geração, pertence ao grupo dos beta-lactâmicos. As cefalosporinas inibem a síntese da parede celular, inibem também a divisão e o crescimento celular; com frequência ocorre a lise e a alongação das bactérias sensíveis. As bactérias que se dividem de forma rápida são as mais sensíveis à ação das cefalosporinas. Desenvolve sua ação

preferencialmente sobre cocos Gram-negativos e bacilos, mas menos efetivas contra estafilococos (Schellack, 2004). São utilizadas para combater infecções no trato respiratório e geniturinário, infecção da pele e tecidos moles. Pode apresentar efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, náuseas, vômitos e diarreia. Reações dermatológicas por hipersensibilidade. Infecções oportunistas por microrganismos não suscetíveis (*Candida* sp., *Pseudomonas* sp.). Sua administração é via oral, sua excreção é via renal. Apresenta níveis séricos máximos de 17 µg/mL, é rapidamente absorvida, eliminada do sangue em 8 horas e com meia vida de 40 minutos. Cerca de 60% é excretada inalterada na urina em 2 horas. (Newman & Kornman, 1997).

2.2.2.2. LINCOSAMINAS

Dentre o grupo das lincosaminas a **clindamicina** é o único antimicrobiano que possui indicação odontológica, sendo derivada da lincomicina (droga padrão do grupo). Seu mecanismo de ação é exercido mediante a inibição da síntese protéica em bactérias sensíveis; une-se às subunidades 50 S dos ribossomos bacterianos e evita a formação das uniões peptídicas. Geralmente considerada bacteriostática, podendo, porém, ser bactericida quando usada em concentrações elevadas ou frente a microrganismos altamente sensíveis. A Clindamicina apresenta espectro de ação semelhante ao das penicilinas, com diferença que atingem o *S. aureus* e outras bactérias produtoras das penicilidasas. Também atuam contra bacilos aneróbios Gram-negativos como o *Fusobacterium nucleatum*. Entretanto, *Clostridium difficile* sobrevive a ação da clindamicina (Groppo *et al.*, 2006). A clindamicina é metabolizada no fígado e excretada na bile, sua administração é via oral e apresenta níveis séricos máximos de 5 µg/mL em 45 min. A clindamicina é rapidamente absorvida não dependente de alimentos e apresenta meia vida de 2 horas (Newman & Kornman, 1997).

2.2.2.3. MACROLÍDEOS

A **Eritromicina** pertence ao grupo dos macrolídeos. É um bacteriostático, liga-se à subunidade 50S dos ribossomos bacterianos, suprimindo sua síntese protéica. É um antibiótico seguro em uso e é freqüentemente uma alternativa satisfatória à penicilina, principalmente em casos de pacientes alérgicos à penicilina. Ela é disponível para a administração em forma oral em quatro formas: (1) eritromicina base, (2) como um sal, estearato de eritromicina, (3) como éster, etilsuccinato de eritromicina e como (4) estolato e eritromicina. Apresenta o espectro antimicrobianos da penicilina G, mas também é efetiva contra vários outros microrganismos adicionais, incluindo alguns atípicos como *Bordetella pertussis*, *Moxarella catarrhalis*, *Chlamydia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Rickettsia* sp. (Schellack, 2004). É um dos antibióticos com poucos efeitos colaterais. Cerca de 93% dos indivíduos que apresentaram colestase como manifestação tóxica da eritromicina haviam tomado a forma de estolato, devendo esta portanto ser evitada. A eritromicina base é metabolizada primeiramente no fígado e depois nos rins, apresenta níveis séricos máximos de 1 µg/mL, com meia vida de 1,5 horas. Já o etilsuccinato de eritromicina é metabolizado no fígado, apresenta níveis séricos máximos de 1 µg/mL, com meia vida de 1,5 horas (Newman & Kornman, 1997).

A **azitromicina** pertence ao grupo dos novos macrolídeos, apresenta atividade antimicrobiana semelhante a dos macrolídeos, porém inova na possibilidade de administração única ao dia, por possuir uma meia-vida longa. Apresenta maior resistência à degradação ácida do estômago, redução dos efeitos colaterais gástricos e ampliação das propriedades terapêuticas (Compendio Médico, 1999).

2.2.2.4. NITROIMIDAZÓLICOS

O **metronidazol** pertence ao grupo dos nitroimidazólicos. É uma droga de baixo peso molecular, por isso, apresenta uma ampla distribuição nos tecidos e fluídos do organismo, tendo poder bactericida. Possui espectro de ação contra

protozoários e bactérias anaeróbias como o *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Peptococcus* sp., *Peptostreptococcus* sp. e outros bacilos Gram-positivos. O metronidazol é efetivo apenas contra microrganismos anaeróbios estritos, portanto a associação com a penicilina G completa seu espectro de ação contra os enterococos anaeróbios facultativos. Pode apresentar vários efeitos colaterais como náuseas, dores abdominais, gosto metálico, neutropenia reversível. Raramente pode ocorrer neuropatia periférica, convulsões, disfunções cerebrais e reação ao álcool (tipo dissulfiram). Sua administração é via oral e é metabolizado nos rins, apresenta níveis séricos de 12 µg/ml com 500 mg da dose e meia vida de 8 horas (Newman & Kornman, 1997).

2.2.2.5. USO DE ANTIBIÓTICOS EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

O uso de antibióticos por via sistêmica, nos casos de infecções endodônticas é indicado na profilaxia antibiótica de pacientes de risco para endocardite bacteriana durante a terapêutica endodôntica ou quando há infecções periapicais agudas com a presença de sinais e sintomas de disseminação do processo infeccioso, tais como febre, mal estar, celulite ou trismo (Bergenholtz & Crawford, 1989; Abbott *et al.*, 1990; Grad, 1997; Andrade 2006).

O uso de antibióticos sistêmicos em pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana é um importante complemento à terapêutica endodôntica, sendo utilizado em regime profilático (Abbott *et al.*, 1990; Grad, 1997). De acordo com as recomendações da *American Heart Association* o uso profilático de antibióticos é recomendado nos seguintes procedimentos endodônticos: instrumentação além do ápice dental, cirurgia perirradicular e reimplante de dentes avulsionados (Dajani *et al.*, 1997; Grad, 1997).

As condições cardíacas consideradas de alto risco de acordo com a *American Heart Association* são: válvulas cardíacas protéticas, endocardite bacteriana prévia, condutos pulmonares sistêmicos construídos cirurgicamente e doenças cardíacas cianóticas complexas, como estados ventriculares simples, transposição de grandes artérias e tetralogia de Fallot. As de risco moderado

compreendem: a maioria das malformações cardíacas congênitas, disfunção valvular adquirida, cardiomiopatia hipertrófica, prolapso da válvula mitral com regurgitação valvular e/ou espessamento dos folhetos valvulares. Em ambas condições, recomenda-se o regime antimicrobiano profilático para prevenção da endocardite bacteriana (Dajani *et al.*, 1997; Andrade, 2006).

O regime profilático padrão recomendado pela *American Heart Association* consiste em uma administração de 2g de amoxicilina para adultos e de 50 mg/kg para crianças, em dose única, por via oral, uma hora antes do procedimento. Os antibióticos amoxicilina, ampicilina e penicilina são igualmente efetivos, *in vitro*, contra os estreptococos α -hemolíticos, entretanto, a amoxicilina é recomendada porque é melhor absorvida pelo trato gastrointestinal, proporcionando níveis séricos elevados e duradouros. Aos alérgicos às penicilinas é recomendado o uso da clindamicina 600 mg ou azitromicina 500 mg para adultos; para crianças, azitromicina 15 mg/kg de peso corporal, por via oral, também em dose única, administrada uma hora antes do atendimento (Andrade, 2006).

Souza-Filho & Andrade (2006) recomendam o uso de antibióticos no tratamento dos abscessos apicais agudos localizados, quando os pacientes são portadores de doenças sistêmicas caracterizadas por alterações metabólicas e por imunossupressão, como se observa nos diabéticos, portadores de doença renal crônica, lúpus eritematoso sistêmico, etc. Além desses casos, quando houver abscessos apicais agudos acompanhados de sinais e sintomas físicos como a presença de dor severa, celulite ou outros sinais importantes como linfadenite, trismo, febre, taquicardia, falta de apetite e mal-estar geral. Nesses casos, o regime antibiótico recomendado para pacientes adultos e crianças maiores que 12 anos é 1 g de Amoxicilina nos casos de abscessos apicais localizados na região sub-perióstica ou submucosa; em casos de alergia 1g de eritromicina ou 500 mg de azitromicina. Em casos de abscessos apicais com características de maior gravidade, como a presença de celulite na região sublingual, submandibular ou periorbital recomenda-se 1g de amoxicilina associada a 250 mg de metronidazol; em casos de pacientes alérgicos, 600 mg de clindamicina.

Nos casos em que houve a necessidade do uso de antibióticos, após feita a dose inicial de ataque (previamente aos procedimentos clínicos de drenagem), deve-se prescrever as doses de manutenção, cujo período de duração do tratamento vai depender do curso da infecção. A prescrição deve ser feita inicialmente por 3 dias. Antes de completar esse período de 72 horas, nova avaliação do quadro deve ser realizada para decidir pela interrupção da administração do antibiótico ou manutenção por mais 1, 2, 3 ou mais dias. O único parâmetro para a suspensão da antibioticoterapia é a remissão dos sinais e sintomas clínicos. Souza-Filho & Andrade (2006) recomendam 500 mg de amoxicilina a cada 8 horas nos casos de abscessos apicais localizados na região sub-perióstica ou submucosa; em casos de alergia 500 mg de eritromicina a cada 6 horas ou 500 mg de azitromicina a cada 24 horas. Em casos de abscessos apicais com características de maior gravidade, como a presença de celulite na região sublingual, submandibular ou periorbital recomenda-se 500 mg de amoxicilina associada a 250 mg de metronidazol a cada 8 horas; em casos de pacientes alérgicos, 300 mg de clindamicina a cada 8 horas.

Um relato cuidadoso de histórias de alergia e reações a drogas do paciente deve ser realizado, bem como a avaliação de possíveis efeitos colaterais da medicação. Os pacientes devem ser acompanhados durante o procedimento de antibioticoterapia e caso haja persistência dos aspectos clínicos, a mudança do antibiótico deve ser considerada. Bergenholtz & Crawford (1989) sugerem que a segunda escolha do antibiótico deve ser baseada no resultado de cultura e na susceptibilidade antimicrobiana das bactérias envolvidas, entretanto, na prática a escolha do segundo antibiótico também é empírica.

A efetividade de agentes antimicrobianos usados clinicamente para tratamento de dentes com periodontite apical aguda foram avaliadas por vários autores, utilizando diversos métodos, como método de difusão em disco, método de diluição em ágar e E-test. Segue em ordem cronológica alguns desses trabalhos que contribuem para busca de um melhor resultado terapêutico.

Yamamoto *et al.* (1989) avaliaram a efetividade de agentes antimicrobianos usados clinicamente para tratamento de dentes com periodontite apical aguda. Por meio do método de difusão em agar foram avaliadas 91 cepas de *Eubacterium*, 65 cepas de *Peptostreptococcus* e 54 cepas de *Bacteroides* isoladas de canais radiculares de dentes associados à lesão periapical e sintomatologia aguda. Todas as cepas mostraram-se suscetíveis à penicilina, entretanto vários isolados mostraram-se menos suscetíveis à tetraciclina, cephem e macrolídeos. Todas as cepas foram uniformemente resistentes aos aminoglicosídeos. Algumas diferenças foram observadas entre a susceptibilidade das espécies de *Eubacterium* e *Peptostreptococcus*. Os *Bacteroides* mostraram-se suscetíveis a todos antibióticos testados.

Appelbaum *et al.* (1990) por meio do método de difusão em ágar encontraram cerca de 50% de cepas de *Prevotella intermedia* resistentes à penicilina, em 27 cepas testadas. Cerca de 60% das cepas de *Prevotella melaninogenica* (n=31) e *Prevotella loescheii* (n=8) foram resistentes à penicilina. *Porphyromonas asaccharolytica* (n=8) e *Porphyromonas gingivalis* (n=2) apresentaram 12% e 100% de resistência respectivamente. Os autores concluíram que esta alta taxa de resistência foi devido à produção de β -lactamase.

Citron *et al.* (1991) estudaram a susceptibilidade antimicrobiana de 105 espécies de bactérias anaeróbias, isoladas clinicamente, contra cefoxitina, cefotaxima, imipenem, penicilina, metronidazol e clindamicina. Foi utilizado o método E-test e o da diluição em agar. As CIMs foram interpretadas após 24 e 48 horas de incubação de 58 espécies. Os dois métodos apresentaram correlação positiva em 87% (± 1 diluição) e em 89% (± 2 diluições) após 24 horas, e em 86% e 97%, após 48 horas de incubação, respectivamente para E-test e diluição. Afirmaram os autores que o E-test é um método fácil de se utilizar e interpretar, é confiável para se testar a susceptibilidade antimicrobiana, além de ser um método adequado para todos os microrganismos anaeróbios.

Nachnani *et al.* (1992) avaliaram a susceptibilidade antimicrobiana de 60 cepas de patógenos periodontais (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas*

gingivalis, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* e *Capnocytophaga*) pelo método do E-test. Os antibióticos testados foram clindamicina, metronidazol, tetraciclina, ciprofloxacina, cefoxitina e ampicilina. O método de diluição em agar foi utilizado como controle. Para os anaeróbios estritos foram encontrados 100% de sensibilidade aos antibióticos. Para os microrganismos facultativos, a sensibilidade variou de 97% a 100%, menos contra o metronidazol, que teve 75% dos isolados sensíveis.

Couroux *et al.* (1993) compararam o E-test e o método de diluição em agar testando 92 bactérias anaeróbias Gram-negativas (*Bacteroides* sp. e *Porphyromonas* sp.) contra os antibióticos clindamicina, cefoxitina, imipenem e metronidazol. Os resultados dos dois testes foram equivalentes para todos os medicamentos testados, sendo que, para o imipenem, houve uma concordância dos 2 métodos em 91,7% dos testes. Para cefoxitina a relação entre os 2 métodos foi relativamente baixa (67%).

Cullmann *et al.* (1993) estudaram a susceptibilidade de microrganismos anaeróbios isolados em hospital universitário empregando do método de difusão em agar contra os seguintes antibióticos: ampicilina, ampicilina + sulbactam, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina, cefaclor, cefuroxima, cefetamet, clindamicina, doxiciclina e eritromicina. O estudo mostrou que os patógenos Gram-positivos foram amplamente atingidos pelos agentes orais testados. Enquanto que *Bacteroides* sp. encontrados em ambiente hospitalar foram resistentes à maioria dos agentes testados (exceto a clindamicina, amoxicilina + ácido clavulânico e ampicilina + sulbactam).

Massey *et al.* (1995) compararam os métodos do E-test e de diluição em agar. Testaram 95 anaeróbios Gram-negativos e 58 anaeróbios Gram-positivos, houve concordância entre os dois resultados, sendo que, em geral, a susceptibilidade foi maior para os anaeróbios Gram-positivos que para os Gram-negativos.

Spangler *et al.* (1995) testaram a susceptibilidade de 201 anaeróbios estritos pelo método E-test e diluição em agar frente à eritromicina, azitromicina,

claritromicina e roxitromicina. A claritromicina foi levemente mais efetiva que os outros antimicrobianos e não houve discordância de resultados entre os dois métodos.

Duerden (1995) testou a concentração inibitória mínima do metronidazol, penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, imipenem, eritromicina, clindamicina e tetraciclina por meio de E-test e do teste do disco. Um total de 147 microrganismos anaeróbios (45 *Clostridium* sp., 25 *Peptostreptococcus* sp., 10 *Propionibacterium* sp. e 67 bacilos Gram-negativos anaeróbios) foram testados. Os resultados mostraram que *Propionibacterium* sp., um isolado clínico de *Bacteroides fragilis*, um de *Prevotella buccalis* e um de *Bacteroides ureolyticus* foram resistentes ao metronidazol (teste do disco). A maioria das cepas foi suscetível ao imipenem. Três isolados de *Clostridium* sp., dois de *Peptostreptococcus* sp., todos *Bacteroides* sp., e 1/3 dos isolados de *Prevotella* sp. e *Porphyromonas* sp. foram resistentes à penicilina, entretanto todos os isolados foram sensíveis a amoxicilina + ácido clavulânico.

Roache & Yoshinori (1997) investigaram a susceptibilidade antimicrobiana de 148 microrganismos por meio do método de difusão em agar, tanto aeróbios quanto anaeróbios facultativos e estritos, isolados de 20 abscessos odontogênicos contra espiramicina e metronidazol. Dentre os anaeróbios, ambos medicamentos foram efetivos contra *Prevotella* sp., *Eubacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Bacteroides* sp. e *Porphyromonas* sp.

Vigil *et al.* (1997) estudaram a susceptibilidade antimicrobiana de 53 microrganismos isolados de lesões periapicais refratárias removidas cirurgicamente contra penicilina G, cefoxitina, cefotaxima, clindamicina, metronidazol, tetraciclina e eritromicina. Destas, 29 eram anaeróbios estritos, 19 facultativos e 5 aeróbios. O resultado dos testes de susceptibilidade antimicrobiana não mostrou evidências claras de resistência dentre as espécies testadas contra os antibióticos do estudo.

Poulet *et al.* (1999) determinaram a susceptibilidade antimicrobiana de 13 cepas de *Prevotella intermedia* ao metronidazol utilizando o método E-test. Apesar

do pequeno número de cepas avaliadas, foi demonstrada uma ótima atividade do metronidazol contra *P. intermedia*, sendo que as cepas foram 100% suscetíveis a este medicamento.

Kuriyama *et al.* (2000) estudaram por meio de difusão em agar a susceptibilidade antimicrobiana dos principais patógenos identificados em 163 abscessos odontogênicos frente a 7 antibióticos. A Penicilina foi eficiente contra quase todos os patógenos, todavia não funcionou bem contra espécies de *Prevotella* sp. produtoras de β -lactamase. O cefametazol foi efetivo contra todos os patógenos. A eritromicina não foi efetiva contra estreptococos do grupo viridans e a maioria dos *Fusobacterium* sp. A clindamicina apresentou uma forte atividade antimicrobiana sobre anaeróbios. A minociclina foi efetiva contra quase todos os patógenos. A levofloxacina não foi eficiente contra estreptococos do grupo viridans. Concluíram que a penicilina continua sendo um antimicrobiano efetivo contra a maioria dos patógenos provenientes de infecções odontogênicas. O cefametazol, a clindamicina e a minociclina são efetivos contra patógenos resistentes à penicilina.

Lana *et al.* (2001) fizeram a análise microbiológica antes e depois da instrumentação de 31 canais radiculares com polpa necrosada. Os gêneros bacterianos encontrados em maior frequência foram *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus*. *Candida* e *Saccharomyces* também foram isolados. Dentre os anaeróbios estritos, 98,1% foram suscetíveis à penicilina G, 96,3% foram suscetíveis a amoxicilina, enquanto que a eritromicina e a tetraciclina inibiram o crescimento de 59,3% e 92,6% dos isolados clínicos, respectivamente. O Metronidazol foi efetivo contra 96,3% dos anaeróbios estritos. Os resultados comprovaram a eficiência dos antibióticos β -lactâmicos, especialmente Penicilina G.

Kuriyama *et al.* (2002) testaram a susceptibilidade antimicrobiana de microrganismos anaeróbios Gram-positivos isolados de 93 amostras de exsudato purulento proveniente de infecções odontogênicas frente a 11 antibióticos. *Streptococcus* sp., *Peptostreptococcus* sp. e *Gemella* sp. foram suscetíveis à

maioria dos antibióticos testados. O menor índice de susceptibilidade foi o da gentamicina sobre *Streptococcus* sp. (70%). O metronidazol apresentou grande atividade antimicrobiana contra cocos Gram-positivos anaeróbios isolados de infecções odontogênicas. Todos os 11 antibióticos estudados mostraram-se efetivos contra os isolados clínicos testados.

Sousa *et al.* (2003) testaram por meio de E-test a susceptibilidade antimicrobiana de *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* isolados de abscessos periapicais. Os antibióticos testados foram: penicilina G, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. As cepas testadas apresentaram-se sensíveis a todos os antibióticos testados.

Jacinto *et al.* (2003, 2005) utilizaram o método E-test para verificar susceptibilidade de microrganismos isolados de canais radiculares de dentes com e sem sintomatologia e presença de lesões periapicais. Os agentes antimicrobianos testados foram amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, azitromicina, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, eritromicina e metronidazol. Foram testadas as susceptibilidades antimicrobianas das espécies: *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii* e os microrganismos produtores de pigmento negro. A menor susceptibilidade foi apresentada pela *Prevotella intermedia/nigrescens* à benzilpenicilina. Um isolado de *P.gingivalis* mostrou-se resistente à eritromicina e 8 isolados foram resistentes à azitromicina. A amoxicilina, a amoxicilina + ácido clavulânico e cefaclor foram efetivos contra todos os microrganismos testados.

van Winkelhoff *et al.* (2005) avaliaram a título de comparação a resistência antimicrobiana de periodopatógenos de pacientes espanhóis e holandeses. Placas subgingivais de pacientes adultos foram coletadas, e cultivadas em meios de cultura. Foram isoladas as espécies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Micromonas micros* e a susceptibilidade antimicrobiana mensurada por E-test. Os resultados mostraram valores mais elevados de MIC para penicilina, e

ciprofloxacina nas cepas de *F. nucleatum* provindas da Espanha. Fato também observado nas cepas de *P. intermedia* frente à penicilina, amoxicilina e tetraciclina; *M. micros* para tetraciclina, amoxicilina e azitromicina e *P. gingivalis* para tetraciclina e ciprofloxacina. Com base nas concentrações de “breakpoint” as cepas provindas da Espanha mostraram maior resistência. A espécie *F. nucleatum* mostrou-se resistente à penicilina, amoxicilina e metronidazol; *Prevotella intermedia* à tetraciclina e amoxicilina e *A. actinomycetemcomitans* à amoxicilina e azitromicina. Não foi observada resistência dos isolados de *P. gingivalis* da Espanha e Holanda a nenhum dos antibióticos. As diferenças encontradas entre a susceptibilidade antimicrobiana das duas populações enfatiza a necessidade de testar a susceptibilidade antimicrobiana. Além disso, estudos clínicos deveriam levar essas diferenças em conta. Os resultados deste estudo mostram que pode não ser possível utilizar um mesmo protocolo antimicrobiano para o tratamento de periodontite severa em toda União Européia.

3. PROPOSIÇÃO

Os propósitos do presente estudo são:

1. Investigar a microbiota dos canais radiculares infectados contendo polpas necrosadas e lesões periapicais,
2. Investigar a microbiota presente nos canais radiculares infectados antes e após o preparo químico-mecânico e uso de medicamentos intracanaís.
3. Investigar a presença de endotoxinas nos canais radiculares antes e após o preparo químico-mecânico e a utilização de medicação intracanal.
4. Avaliar a ação antimicrobiana da clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio e associação de ambos utilizados como medicação intracanal.
5. Avaliar a susceptibilidade de alguns microrganismos isolados dos canais radiculares frente aos medicamentos: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, clindamicina, cefaclor e metronidazol

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MEDICAMENTOS TESTADOS:

- a) De uso local (teste *in vivo*): Clorexidina gel 2% (Endogel, Itapetininga, SP), Pasta de hidróxido de cálcio e água destilada (9:7), Pasta de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% (1:1).
- b) De uso sistêmico (teste *in vitro*: E-test): benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, cefaclor, metronidazol e clindamicina.

4.2. MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES E EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS

4.2.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 24 pacientes que compareceram na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, os quais possuíam dentes unirradiculares indicados para realização de tratamento endodôntico devido à necrose pulpar com a presença de lesão periapical. Esses dentes não apresentavam comunicação com a cavidade bucal (câmara pulpar fechada). A idade dos pacientes variou entre 18 e 65 anos, sendo 21 do sexo feminino e 3 do sexo masculino. Todos os dentes selecionados eram unirradiculares e assintomáticos. Estes pacientes não fizeram uso de antibióticos num período mínimo de 3 meses para não interferir com a microbiota dos canais radiculares.

4.2.2. PROCEDIMENTOS CLÍNICOS

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual de Campinas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (protocolo nº 111/2002). Os pacientes assinaram a autorização para o tratamento e consentimento para realização da pesquisa. A seguir, foram preenchidas as fichas de exame clínico e foi realizada a avaliação do estado geral do paciente,

exame físico, radiográfico e testes de sensibilidade pulpar (quente e frio).

Previamente à intervenção, foram realizados bochechos com 10 mL de enxaguatório bucal (clorexidina 0,12%) por 1 minuto. Em seguida, os pacientes foram anestesiados localmente, os agentes contaminantes coronários removidos, como a remoção de cárie e restaurações deficitárias. O dente a ser tratado recebeu polimento coronário com pedra pomes e isolamento absoluto. A seguir vedou-se a interface coroa/lençol com cianoacrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP) para evitar uma possível infiltração de saliva. A anti-sepsia do campo operatório (dente, cianoacrilato, grampo, lençol de borracha e arco) foi efetuada usando *swabs* estéreis umedecidos primeiramente em H₂O₂ a 30% (v/v), depois em NaOCl 2,5% por 30 s cada. A seguir foi utilizada solução de tiosulfato de sódio 5% para neutralizar a ação química dos agentes anti-sépticos (Möller, 1966). Após a abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar foram descontaminados novamente com as mesmas soluções e estas neutralizadas. A esterilidade da coroa e isolamento absoluto foi checada com um swab o qual foi plaqueado em placas de *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA, Lab M, Bury, UK) acrescido de 5% sangue de carneiro desfibrinado e incubados em condições de aerobiose e anaerobiose.

4.2.3. COLETA DAS AMOSTRAS, INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO

As amostras foram obtidas sob fluxo contínuo de nitrogênio, para preservar a viabilidade dos organismos anaeróbios. Um cone de papel absorvente estéril foi introduzido no comprimento total do canal (determinado pela radiografia periapical pré-operatória), permanecendo nesta posição por 1 min. Nos caso onde o canal estava seco, este foi umedecido com soro fisiológico, para assegurar uma amostra viável. Foram realizadas seis coletas por paciente, sendo estas realizadas em 4 diferentes consultas.

Primeira consulta:

COLETA 1: no início da primeira intervenção endodôntica (logo após abertura coronária, C1),

COLETA 2: após a instrumentação (C2)

Segunda consulta:

COLETA 3: Sete dias após a instrumentação, previamente à nova instrumentação (C3),

COLETA 4: após nova instrumentação (C4)

Terceira consulta:

COLETA 5: Sete dias, logo após a remoção da medicação intracanal (C5)

Quarta consulta:

COLETA 6: Sete dias após remoção da medicação intracanal (C6)

Os cones de papéis, após a realização da coleta, foram colocados em “ependorfs” de 1,0 mL contendo meio de Transporte “Reduced Transport Fluid”, (RTF – Dahlén *et al*, 1992) codificados para que as identificações microbianas fossem realizadas de forma cega. Esses ependorfs foram transportados em 15 minutos para o interior da cabine de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, U.K.), situada no Laboratório de Microbiologia Endodôntica. Na cabine, o frasco foi agitado mecanicamente por 1 min para facilitar a dispersão dos microrganismos. A seguir, foram realizadas diluições em série (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000) com “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB, Lab M, Bury, UK). Cinquenta µL de cada diluição foi inoculado em placas pré-reduzidas de “Fastidious Anaerobe Agar” (FAA, Lab M, Bury, UK) acrescidas de 5% sangue de carneiro desfibrinado contendo ou não antimicrobianos. Essas placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 10% de H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento lento. Diretamente sobre uma placa

de “agar Sabouraud” contendo cloranfenicol foram inoculados 50µL do RTF, não diluídos, para permitir o crescimento de fungos. Cem µl foram inoculados em placas de “Brain Heart Infusion” (BHI, Oxoid, Basingstoke, UKJ) ágar sangue e incubadas aerobicamente a 37°C, por 2 dias, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.

4.2.4. ISOLAMENTO MICROBIANO

As amostras foram inoculadas em meios de cultura e incubadas como a seguir:

- FAA (Fastidious Anaerobe Agar) ágar-sangue acrescidos de hemina (5 mg/L), e vitamina K1 (1 mg/L) a 37°C, aerobicamente, por 2 dias (aeróbios e anaeróbios facultativos);
- FAA ágar-sangue, 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias.
- FAA + NAL [ácido nalidíxico, 0.001% (peso/volume)] + VAN [vancomicina, 0.5 mg/l] ágar-sangue, 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos.
- FAA + KAN [kanamicina, 0.0075% (peso/volume)] + VAN [vancomicina, 0.5 mg/l] ágar-sangue, 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos (particularmente os produtores de pigmento negro).
- FAA + NEO [neomicina, 0.0075% (peso/volume)] ágar-sangue, 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.
- FAA + NAL (ácido nalidíxico) ágar-sangue, 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-positivos e actinomicetos.
- placas de Brain Heart Infusion (BHI) agar (Oxoid, Basingstoke, UK) contendo 5% de sangue de carneiro incubadas aerobicamente a 37°C, por 2 dias, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos

- Ágar Dextrose “Sabouraud” (Oxoid, Basingstoke, U.K.) acrescido de cloranfenicol (500 mg/l), 37°C por 2 dias em aerobiose, para o crescimento de fungos e leveduras.

Após a incubação, cada placa foi examinada e os diferentes tipos de colônias foram subcultivados em placas de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado recém-preparados e pré-reduzidos (para obter culturas puras das espécies presentes nos canais radiculares). As colônias foram selecionadas para a sua identificação inicial por meio das diferenças na aparência destas nas placas. O reconhecimento morfológico das colônias foi feito pelo: tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade, efeito no ágar e efeito no sangue (nenhum, hemólise parcial, hemólise completa). As colônias puras foram inicialmente identificadas pela morfologia da coloração de Gram, requerimentos gasosos e habilidade de produzir catalase. A especificação foi alcançada por meio de testes bioquímicos padronizados, apropriados para identificação.

Para determinação dos requerimentos gasosos cada colônia obtida anaerobicamente foi inoculada em duas placas de FAA + 5% acrescida de sangue de carneiro desfibrinado. Uma placa foi incubada por 2 dias aerobicamente e a outra pelo mesmo período de tempo anaerobicamente. Estas placas foram comparadas para determinar se os isolados eram anaeróbios facultativos ou obrigatórios. As espécies que cresceram somente em anaerobiose, foram incubadas em estufa de CO₂ e se não houve nenhum crescimento, estas foram consideradas anaeróbias estritas. A morfologia bacteriana foi confirmada após cada incubação pela coloração de Gram.

4.2.5. ESPECIFICAÇÃO MICROBIANA

Testes bioquímicos padronizados foram utilizados para especificação dos organismos isolados:

- Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios.

- RapID ANA II System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA) para cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-negativos de pigmento negro, anaeróbios obrigatórios
- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os estafilococos e micrococos (cocos Gram-positivos, catalase positiva)
- API C AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para fungos e leveduras
- Rapid ID 32 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa)
- RapID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, Ga., USA) para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Actinobacillus*

4.2.6. PREPARO DOS CANAIS RADICULARES E COLETA DAS AMOSTRAS

4.2.6.1. PRIMEIRA SESSÃO DE ATENDIMENTO

Uma vez realizada a coleta inicial (**C1**), as câmaras pulpares foram descontaminadas com a utilização da clorexidina gel a 2% (Endogel, Itapetininga, SP). O preparo da entrada dos canais foi complementado com realização dos desgastes compensatórios, utilizando a broca diamantada #3082 e as brocas de largo #2 e #3 (DYNA - FFDM, Bourges, França). A seguir foi realizada a patência dos canais, empregando uma lima K #10 ou #15 (DYNA - FFDM, Bourges, França) a dois milímetros do comprimento aparente do dente (CAD). O acesso cervical foi realizado com as limas rotatórias (Endoflare – Micromega, Besançon, França) As limas rotatórias foram utilizadas em peça de mão acionada por motor elétrico com velocidade de 150 a 350 rotações por minuto (rpm). Em seguida foram utilizadas as brocas de Gates-Glidden #5, #4, #3, #2 (DYNA - FFDM, Bourges, França) trabalhando até 2 mm aquém do comprimento preparado pelas limas rotatórias. A seguir, foi selecionada uma lima que melhor se adaptou ao diâmetro anatômico do canal, localizada a 1 mm do CAD para realização da odontometria e determinação do Comprimento de Trabalho (CT) por localizador

apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel), esta lima selecionada era denominada lima anatômica inicial (LAI). Nesse momento realizou-se a patência dos forames com limas #15 e #20. O preparo apical foi realizado manualmente com limas DYNA (FFDM, Bourges, França). A lima que determinou a seleção do cone foi à lima anatômica final (LAF), que correspondente a três limas a partir da LAI. Em seqüência, foi realizado o preparo *Step-Back*.

Durante o preparo químico mecânico (PQM), os canais foram preenchidos com 1 ml de clorexidina gel a 2% (Endogel, Itapetininga, SP) a cada troca de instrumento, e recapitulados com a LAI e 4 mL de soro fisiológico. Após a instrumentação, os canais foram irrigados com 4 mL de solução de *tween* 80 + lecitina de soja, para neutralizar a ação do agente irrigante (Siqueira *et al.*, 1998). Em seguida, nova amostra bacteriológica foi realizada (**C2**), utilizando os mesmos procedimentos de coleta, isolamento e identificação). Os canais foram lavados novamente com 4 mL de soro fisiológico e não foram secos, de maneira que ficassem preenchidos. A seguir foi colocada uma bolinha de algodão estéril na embocadura do canal radicular, uma camada de 2 mm de CAVIT, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, USA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, USA).

4.2.6.2. SEGUNDA SESSÃO DE ATENDIMENTO

Após 7 dias da instrumentação inicial, nova coleta foi realizada (**C3**). A seguir, os dentes foram reinstrumentados utilizando CHX gel 2% (LAF da primeira sessão de atendimento mais duas limas). A seguir, os canais foram irrigados com 4 mL de solução de *tween* 80 e lecitina de soja, para neutralizar a ação do agente irrigante (Siqueira *et al.*, 1998) e nova coleta foi realizada (**C4**). Após a coleta, os canais foram irrigados com 4 mL de soro fisiológico e colocada uma medicação intracanal. A escolha da medicação a ser utilizada foi realizada de forma randomizada.

Grupo 1 (8 dentes): os canais deste grupo foram secos com cone de papel e preenchidos com **clorexidina gel 2%**.

Grupo 2 (8 dentes): os canais deste grupo foram secos com cone de papel, preenchidos com uma pasta de **Ca(OH)₂ com água destilada**, com auxílio de uma lentulo e lima (Malleifer-Dentsply, Bailagues, Suíça).

Grupo 3 (8 dentes): os canais deste grupo foram secos com cone de papel, preenchidos com uma pasta de **Ca(OH)₂ com clorexidina gel 2%**, com auxílio de uma lentulo e lima (Malleifer-Dentsply, Bailagues, Suíça).

Na câmara pulpar de todos os grupos foi colocada uma bolinha de algodão estéril na embocadura do canal radicular, 2 mm de CAVIT, aplicado de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, USA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, USA).

4.2.6.3. TERCEIRA SESSÃO DE ATENDIMENTO

Transcorrendo-se o período de 7 dias, os pacientes foram novamente atendidos. Os canais irrigados com 3 mL solução fisiológica, e com auxílio da LAI os medicamentos intracanaís foram removidos. Nova coleta foi realizada (**C5**). Os canais foram preenchidos com soro fisiológico, a seguir foi colocada uma bolinha de algodão estéril na embocadura do canal radicular, uma camada de 2 mm de CAVIT, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, USA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, USA).

4.2.6.4. QUARTA SESSÃO DE ATENDIMENTO

Transcorrendo-se o período de 7 dias, uma nova coleta foi realizada (**C6**), os microrganismos foram isolados, identificados e as unidades formadoras de colônia contadas. A seguir os canais foram reinstrumentados e obturados utilizando a técnica da FOP-UNICAMP.

O procedimento restaurador de todos os dentes foi realizado com a colocação de 2 mm de CAVIT na embocadura dos canais, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, USA) e aplicação em camadas de resina fotopolimerizável Z 250 (3 M Dental Products, St. Paul, USA).

4.3. TESTE CROMOGÊNICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS LAL (QCL-1000, CAMBREX, WALKERVILLE, MD, USA)

Para a realização do teste LAL, todo material utilizado era apirogênico (livre de endotoxinas) proveniente da CAMBREX (WALKERVILLE, MD, USA), ou outros materiais, como por exemplo as pinças clínicas, vidros contendo esferas de vidro (utilizados para coleta), foram esterilizados a 200 °C por meio de calor seco (estufa) por um período de 4 horas.

4.3.1. COLETA

A coleta das amostras de endotoxina foi realizada simultaneamente à coleta microbiológica. Um cone de papel (o segundo cone foi utilizado) foi colocado no canal por um minuto e transferido para tubos apirogênicos com 6 esferas de vidro também apirogênicas. As amostras foram armazenadas a -20 °C (como recomendado pelo fabricante) para a realização dos testes em bloco.

4.3.2. PADRONIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO

O estabelecimento de uma curva padrão com quantidades de endotoxinas conhecidas é necessário para determinar a concentração de endotoxinas com quantidades desconhecidas. Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 1,0 UE/mL, 0,5 UE/mL, 0,25 UE/mL e 0,1 UE/mL como descrito na tabela abaixo:

Tabela 1. Estabelecimento de uma curva padrão nas concentrações 1,0 UE/mL, 0,5 UE/mL, 0,25 UE/mL e 0,1 UE/mL

TUBO	Concentração de endotoxina UE/mL	Solução estoque de endotoxina (potência de 25 UE/mL)	Solução de endotoxina padrão (tubo 1)	LAL água reagente
1	1,0	0,1 ml	-	25*-1/10 ml
2	0,5	-	0,5 ml	0,5 ml
3	0,25	-	0,5 ml	1,5 ml
4	0,1	-	0,1 ml	0,9 ml

*potência de 25 UE/mL

Tubo 1: para preparar a solução de endotoxina padrão na concentração 1,0 UE/mL foi utilizado 0,1 ml da solução estoque de endotoxina de E. coli em 2,4 ml de LAL água reagente (25*-1/10 ml). A solução foi vigorosamente agitada por 60 segundos.

Tubo 2: 0,5 ml da solução do tubo 1 (1,0 UE/mL) foi colocada em 0,5 ml de LAL água reagente, resultando em uma concentração 0,5 UE/mL.

Tubo 3: 0,5 ml da solução do tubo 1 (1,0 UE/mL) foi colocada em 1,5 ml de LAL água reagente, resultando em uma concentração 0,25 UE/mL.

Tubo 4: 0,1 ml da solução do tubo 1 (1,0 UE/mL) foi colocada em 0,9 ml de LAL água reagente, resultando em uma concentração 0,1 UE/mL.

4.3.3. PADRONIZAÇÃO DAS DILUIÇÕES DAS AMOSTRAS

O teste LAL pode ser afetado por muitos fatores. Fatores de inibição devem ser evitados para isso foi realizada a adição de uma quantidade conhecida de endotoxina (0,4 UE/mL), este procedimento é denominado “Spike”. A concentração conhecida foi adicionada a diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 de 8 amostras (2 iniciais, 2 após instrumentação, 2 previamente a colocação da medicação intracanal, 2 após o uso de medicação intracanal). Os testes foram realizados como será descrito a seguir. O resultado da concentração das amostras diluídas deveriam estar dentro da curva padrão. A diluição 1:100 foi aquela que

apresentou maiores números de amostras dentro desse padrão, então foi a selecionada para a realização dos testes de todas as amostras.

4.3.4. REALIZAÇÃO DOS TESTES

Para a realização dos testes foi utilizado o método LAL, que consiste em um Lisado de Amebócito de *Limulus* e um substrato corante sintético para detectar endotoxinas cromogenicamente (Quantitative Chromogenic LAL-1000, Whittaker Bioproducts). Com este método, uma cor amarela de várias intensidades quando em contato com as endotoxinas.

O *Kit* QCL-1000 possui: 2 frascos (30 ml de água apirogênica); endotoxina liofilizada de *E. coli* (25 UE/mL, reconstituída com 1ml de água apirogenica); 2 frascos de substrato cromogênico liofilizado (7mg, reconstituídos em 6,5 ml de água apirogênica) e 5 frascos de LAL liofilizado (reconstituídos em 1,4 ml de água). O ácido acético 25% foi utilizado para paralisar a reação (“stop reagent”).

Para a quantificação da endotoxina presente nas amostras foram utilizadas placas de culturas de células (96 poços – 12 colunas e 8 fileiras) apirogênicas. A tabela abaixo descreve os procedimentos realizados e a figura abaixo representa a montagem da placa.

Tabela 2. Procedimentos para realização do teste cromogênico LAL (QCL-1000)

	Amostras e Curva Padrão	“Blank” controle negativo
Amostra (diluição 1:100) Curva Padrão	50 µl	-
LAL água reagente	-	50 µl
LAL reconstituído	50 µl	50 µl
Agitação por 60 segundos e incubação por 10 minutos a 37 °C		
Solução de substrato reconstituído	100 µl	100 µl
Agitação por 60 segundos e incubação por 6 minutos a 37 °C		
“Stop Reagent” (ácido acético 25%)	100 µl	100 µl

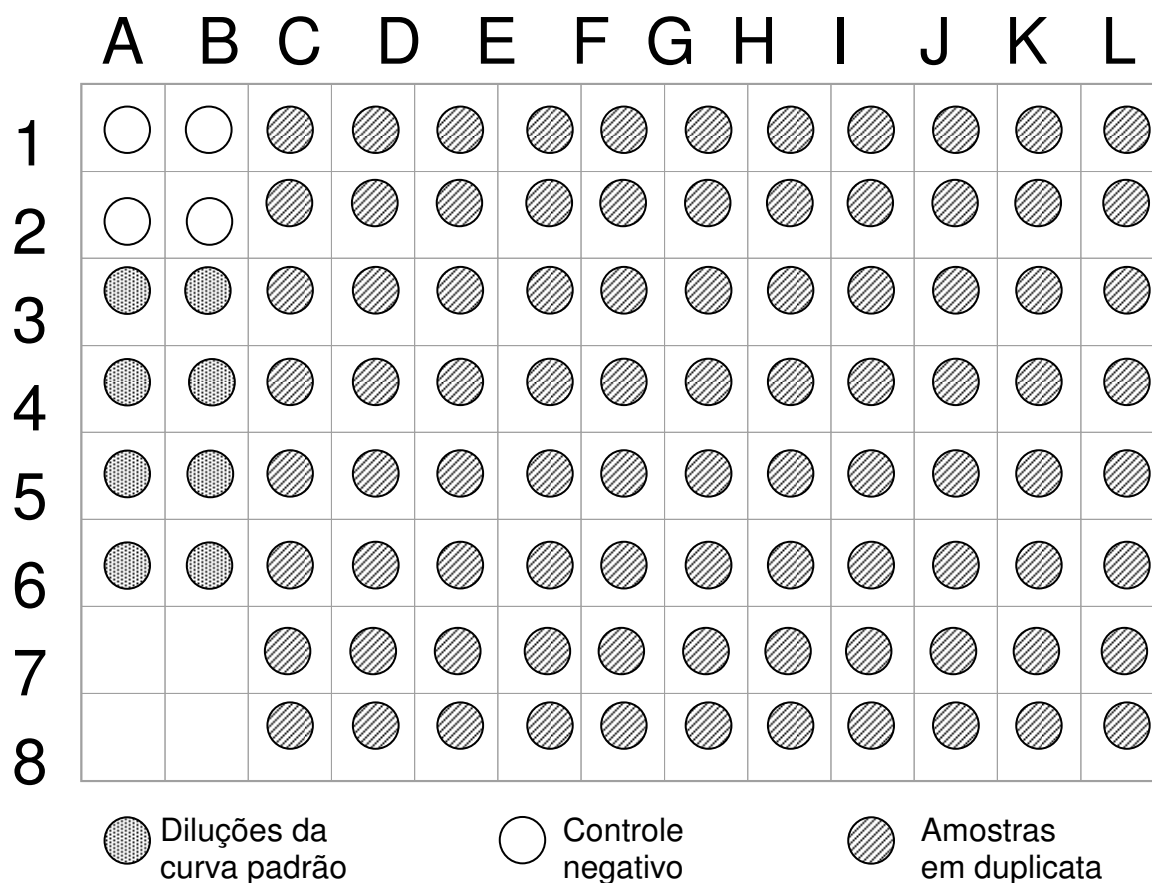


Figura 4. Disposição das amostras, curva padrão e controle negativo nas placas.

Para quantificação das endotoxinas das amostras foram necessários: a) 8 poços contendo 50 µl da curva padrão (1,0 UE/mL, 0,5 UE/mL, 0,25 UE/mL e 0,1 UE/mL em duplicata); b) 2 controles negativos (“Blank”) contendo 50 µl da água reagente LAL ao invés da amostra para ser usado como controle negativo e c) 50 µl das diluições (1:100) das amostra também em duplicata.

Cinquenta µl do LAL reconstituído foi adicionado em cada um dos poços, agitados por 60 segundos e incubados por 10 minutos a 37°C. A seguir, foram adicionados 100 µl do substrato cromogênico, agitados e incubados por 6 minutos a 37 °C, depois disto, 100µl do “stop reagent” (ácido acético) foram adicionados e as amostras agitadas. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Rad 450, Ultramark, Japan) a 405 nm.

4.3.5. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA

Dentro das condições da curva padrão, absorvância de 405 nm a concentração de endotoxina deve-se encontrar entre 0,1 a 1,0 UE/mL. Há vários métodos para determinar a concentração de endotoxina nas amostras. Para chegar à concentração final foi utilizado o método do cálculo de regressão linear da média de absorvância da curva padrão (as concentrações spike foram deduzidas).

Os cálculos foram realizados em uma planilha do excel fornecida pelo fabricante. Para entender quais os dados utilizados para o cálculo faz-se necessário conhecer alguns dados obtidos dos resultados das amostras.

r= eficiência da curva padrão

x= concentração de endotoxina

y= media dos valores da absorvância

N= número de curvas padrões utilizadas

X= somatória da concentração de endotoxina da curva padrão em UE/mL

Σy = somatória dos valores da média de absorvância

Σxy = somatória concentração de endotoxina da curva padrão em UE/mL e somatória dos valores de absorvância

$$S_x = \text{desvio padrão de } x = \sqrt{\frac{N \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}{N(N-1)}}$$

$$S_y = \text{desvio padrão de } y = \sqrt{\frac{N \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{N(N-1)}}$$

$$\text{Slope} = \frac{S_y}{S_x} \cdot r$$

$$Y = \text{intercepto} = \Sigma y / N - (\Sigma x / N \cdot \text{Slope})$$

$$r = \frac{N \Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{N(N-1) S_x S_y}$$

$$\text{CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA} = \frac{\Delta \text{ absorbance} - y - \text{intercepto}}{\text{Slope}}$$

Para chegar à concentração final deve-se multiplicar pelo fator de diluição em que as amostras foram utilizadas (1:100 multiplicar por 100 a concentração obtida pelo cálculo matemático). No presente estudo o valor de r foi 0,999, um valor de r aceitável é $\geq 0,980$. Caso o valor esteja abaixo deste valor o operador deve realizar a calibração até que atinja o nível aceitável para realizar os testes com todas as amostras.

4.4. EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS ISOLADOS DOS CANAIS RADICULARES (E- TEST)

Foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana (método do E-test, AB BIODISK, Solna, Suécia), as bactérias anaeróbias estritas do gênero *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e as espécies *Propionibacterium propionicum* e *Propionibacterium acnes* isoladas dos canais radiculares estudados. Os agentes antimicrobianos testados foram: cefaclor (CF), benzilpenicilina (PG), amoxicilina (AC), amoxicilina + ácido clavulânico (XL), clindamicina (CM), eritromicina (EM) metronidazol (MZ) e azitromicina (AZ).

O sistema do E-test consiste em uma fita plástica inerte e não porosa de 50 mm de comprimento e 5 mm de largura, que contém gradiente de concentração de antibiótico com escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita do E-test pode detectar a concentração inibitória mínima (CIM) que varia de 0,016 a 256 $\mu\text{g/ml}$, com um total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström 1993).

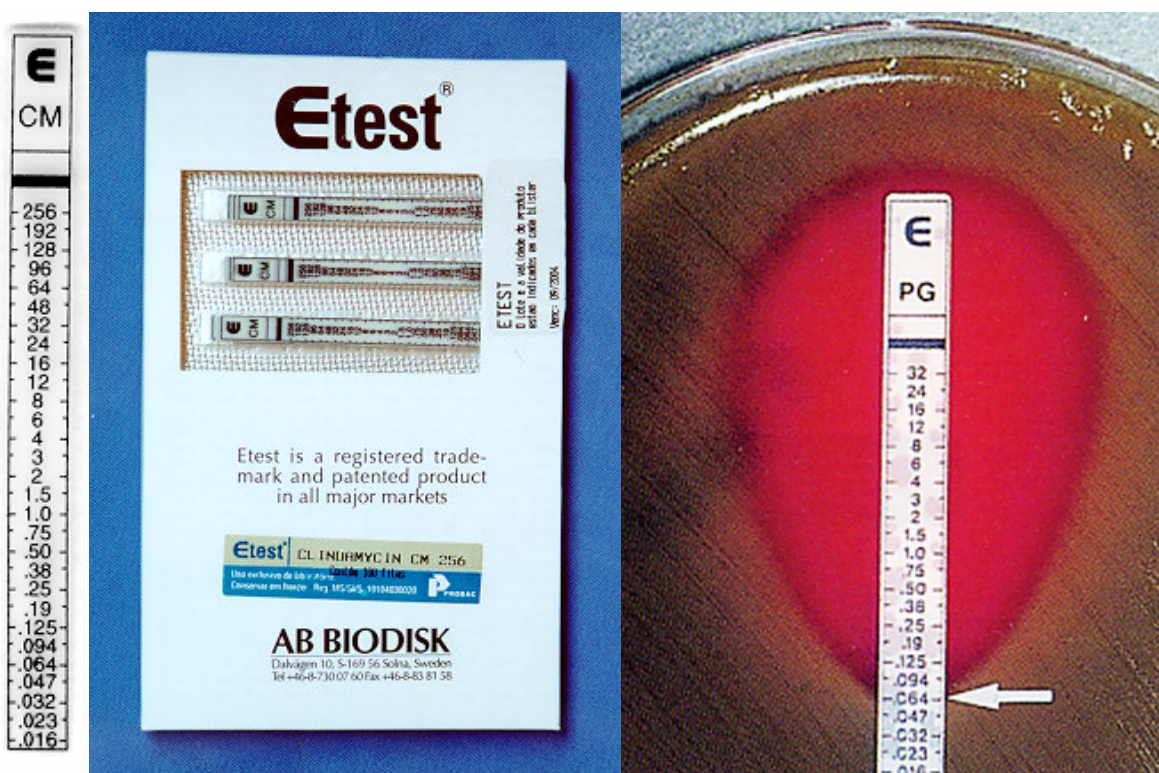


Figura 5. E-test

Colônias puras 24 - 48 h foram suspensas em “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB), agitadas e padronizadas em espectrofotômetro D.O. 800 nm a transmitância 80 (equivalente ao padrão McFarland 1 - NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil) para bactérias anaeróbias estritas.

Os microrganismos anaeróbios estritos foram plaqueados com *swab* estéril em placas de Brucella Agar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, enriquecidas com 1% de vitamina K1 (1 mg/l) + 0,5% de hemina (85 mg/l). Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test foram distribuídas nas placas com o auxílio de pinça estéril para cada substância a ser testada. O experimento foi executado em duplicata em fluxo laminar.

As placas contendo as bactérias anaeróbias estritas foram imediatamente incubadas em uma câmara de anaerobiose, a 37°C em atmosfera de 10% H₂, 10%

CO₂ e 80% N₂. A leitura foi realizada após 24 e 48 h de incubação. As CIMs foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento.

De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada seguindo o guia de interpretação da NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), também utilizadas nas publicações de Kuriyama *et al.* (2000), van-Winkenhoff *et al.* (2004) e Jacinto *et al.* (2005).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção dos dados, estes foram analisados utilizando o programa SPSS for windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

1. Diferenças na prevalência das diferentes espécies dentro das coletas e a presença de fístula (na coleta 1), foram comparadas por meio do teste de Cochran para dados nominais. Para testar a hipótese nula de relação entre as espécies foi utilizado o teste de Fischer ($p < 0,05$). Nos casos em que essa hipótese foi descartada, ou seja, quando houve diferenças entre as espécies ($p < 0,05$), o teste de Odds ratio foi realizado. Associações positivas foram aquelas em que Odds ratio foi maior que 2 e para associações negativas aquelas em que os valores de Odds ratio foram menores que 0,5.

2. Para testar a mudança na microbiota entre as coletas (antes e depois dos procedimentos, por exemplo as coletas C1 e C2, C2 e C3) foi utilizado o teste de McNemar.

3. Para avaliar as diferenças entre os medicamentos intracanaís foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Foram utilizados os valores obtidos da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), número total de espécies e concentração de endotoxinas.

4. Para avaliar “sucesso” (redução) nas diversas fases do tratamento foi utilizado o teste de Friedman (para dados não paramétricos) e post-hoc Wilcoxon. Os dados

obtidos contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), número total de espécies e concentração de endotoxinas foram comparados entre diferentes coletas.

5. Foram testadas as possíveis correlações entre quantidade de endotoxina, quantidade de microrganismos, número de espécies dentro de cada coleta por meio do teste de Correlação de Spearman, na coleta C1 foram testadas também possíveis correlações com o tamanho das lesões radiográficas.

5. RESULTADOS

Todos os “swabs” utilizados para coleta após a desinfecção da coroa e áreas ao redor apresentaram resultados negativos para espécies microbianas, indicando uma adequada desinfecção da coroa.

As radiografias periapicais realizadas após a colocação dos medicamentos intracanaís mostraram que os canais que continham hidróxido de cálcio estavam bem preenchidos. A clorexidina não apresenta radiopacidade, por isso não foi possível verificar seu preenchimento por radiografia periapical.

Todos os dentes foram reinstrumentados após a coleta C6 e por não apresentarem sintomatologia e estarem sem a presença de exudato foram obturados e restaurados com material definitivo na quarta sessão de atendimento.

5.1. MICROBIOTA PRESENTE NOS CANAIS RADICULARES INFECTADOS CONTENDO POLPAS NECROSADAS E LESÕES PERIAPICAIS

Todos os 24 dentes com necrose pulpar e lesões periapicais examinados apresentaram bactérias cultiváveis, as quais pertenciam a 34 diferentes espécies e 18 diferentes gêneros.

Foram isolados um total de 81 microrganismos nos canais examinados, o maior número de bactérias encontradas foi de 7 microrganismos por canal (Tabela 9, C1). O número de microrganismos isolados variou de 1 a 7, em média 3,3 por canal radicular (Tabela 3).

Houve uma predominância de bacilos Gram-positivos e os menos encontrados foram os cocos Gram-positivos. Com relação ao requerimento gasoso, pôde-se verificar que a maioria dos microrganismos isolados foi de anaeróbios estritos (Tabela 3).

Os microrganismos mais freqüentemente encontrados nos canais radiculares com lesão periapical foram *Propionibacterium acnes* (7 casos), *Gemella morbillorum* (7 casos), *Actinomyces naeslundii* (6 casos), e *Eubacterium lentum* (6 casos) (Tabela 6). Os gêneros mais freqüentemente encontrados nos

canais radiculares com lesão periapical foram *Actinomyces* sp., *Prevotella* sp., *Propionibacterium* sp., *Eubacterium* sp. e *Clostridium* sp.

Foram encontradas associações positivas entre os microrganismos *Eubacterium lentum* e *Fusobacterium nucleatum* ($p=0.03$; OD=17; IC=1,3 a 223,1), *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia* ($p=0.02$; OD=2; IC=0,75 a 5,3) e *Propionibacterium* sp. e *Fusobacterium* sp. ($p=0.02$; OD=11,2; IC =1,0 a 125,6) e uma associação negativa entre *Prevotella* sp. e *Porphyromonas* sp. ($p=0.05$; OD=0,19; IC=0,08 a 0,046).

A quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) encontradas nos 24 canais radiculares variou entre 4×10^2 e $2,7 \times 10^6$ (tabela 11)

5.2. EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS

As 24 amostras estudadas da Coleta 1 apresentaram positivas para a presença de microrganismos (descrito no ítem 5.1). A Coleta 2, realizada logo após a instrumentação, apresentou 13 casos positivos (54,1% dos casos). Após o preenchimento do canal com soro fisiológico por 7 dias (coleta 3), 21 casos (87,5%) foram positivos para a presença de microrganismos. Na coleta 4, após nova instrumentação, esse número caiu para 8 casos (33,3%), voltando a aumentar para 13 (54,1%) casos positivos após 7 dias de medicação intracanal. Na coleta seis, o número de casos positivos volta a subir, apresentando 20 (83,3%) casos positivos (Tabela 3).

Na tabela 3, pode-se verificar o número de microrganismos e espécies encontradas nos casos positivos. O número e espécies variou de 1 a 6 microrganismos por canal dependendo da coleta. Na Coleta 1 foram isolados 81 microrganismos e o número espécies por canal variou de 1 a 7. Na Coleta 2 foram isolados 20 microrganismos e o número de espécies variou de 1 a 4 microrganismos por canal. Foram isolados 41 microrganismos na coleta 3 e o número de espécies variou de 1 a 4 microrganismos por canal. Na coleta 4 foram isolados 11 microrganismos com número de espécies entre 1 e 3 por canal. Na

coleta 5 foram isolados 30 microrganismos com número de espécies entre 1 e 6 por canal radicular e na coleta 6 foram isolados 41 microrganismos com número de espécies entre 1 e 5 e foi constatada a presença de um fungo.

Houve uma predominância, em todas as coletas, de bacilos Gram-positivos e os menos encontrados foram os cocos Gram-positivos. De forma geral os microrganismos Gram-positivos foram os mais freqüentemente isolados, variando entre 67,9% e 82,9% dependendo do da coleta. Com relação ao requerimento gasoso, pôde-se verificar em todas as coletas, que a maioria dos microrganismos isolados foi de anaeróbios estritos (Tabela 3).

A Coleta 5 dividida de acordo com as diferentes medicações intracanaís pode ser vista na tabela 4. A porcentagem de casos positivos após a utilização do Ca(OH)_2 por 7 dias (G1) foi de 62,5% (5 casos), após o uso da CHX gel 2% (G2) ou da associação Ca(OH)_2 + CHX gel 2% (G3) por 7 dias foi de 50%. O número de espécies encontradas por canal variou de 1 a 6 microrganismos dependendo da medicação empregada. A maioria dos microrganismos encontrados foi de bacilos Gram-positivos. Com relação ao requerimento gasoso, pode-se verificar que a maioria dos microrganismos isolados foi de anaeróbios estritos.

A tabela 6 mostra a distribuição dos microrganismos isolados nas diversas fases do tratamento endodôntico de acordo com as características morfológicas. Os microrganismos mais freqüentemente encontrados nos canais radiculares com lesões periapicais (Coleta 1) foram *Propionibacterium acnes* (7 casos), *Gemella morbillorum* (7 casos), *Actinomyces naeslundii* (6 casos) e *Eubacterium lentum* (6 casos). O *Propionibacterium acnes* foi o microrganismo mais freqüentemente encontrado nas coletas C2 (5 casos), C5 (4 casos) e C6 (9 casos).

A tabela 7 mostra a distribuição dos gêneros microbianos encontrados nas diversas fases do tratamento endodôntico. Os gêneros mais freqüentemente encontrados nos canais radiculares com lesões periapicais (Coleta 1) foram *Actinomyces* spp., *Prevotella* sp., *Propionibacterium* sp., *Eubacterium* sp. e *Clostridium* sp. O *Propionibacterium* sp. continuou sendo um dos gêneros mais encontrado em todas as coletas subseqüentes. Nota-se que na coleta 3 o gênero

Peptostreptococcus sp. foi freqüentemente encontrado, sendo também encontrado nas coletas anteriores. Esse mesmo fato ocorreu com os gêneros *Micrococcus* sp. em C5, *Aeorcoccus* sp., *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. em C6.

De acordo com os diferentes medicamentos intracaneais pode-se verificar que os Gram-positivos foram freqüentemente encontrados, especialmente os bacilos Gram-positivos. Estes últimos estiveram presentes mesmo após a utilização dos diferentes tipos de medicação intracanal. Entretanto, no grupo da associação entre hidróxido de cálcio e clorexidina eles apresentaram em menor freqüência que nos outros grupos (Tabela 8).

Associações dentro de uma mesma coleta foram testadas pelo teste exato de Fischer. Na coleta 1 também foram testadas associações com a presença de fístula. As hipóteses nulas de não associações foram rejeitadas com algumas combinações de espécies e gêneros, indicando possíveis associações (duas a duas), as quais foram confirmadas pelo teste de Odds ratio. As associações referentes à coleta 1 foram descritas no item 5.1. Na coleta 2 foi encontrada associação positiva entre *Propionibacterium* sp. e *Clostridium* sp. ($p=0.09$; $OD=12$; $IC=0,81$ a $177,4$), na coleta 5 entre *Gemella morbillorum* e *Clostridium* spp. ($p=0.03$; $OD=40$; $IC=1,74$ a $914,8$).

Quando todos os 24 casos foram analisados em conjunto, as mudanças na microbiota entre as coletas foram verificadas pelo teste McNemar. Diferenças puderam ser observadas para *Eubacterium* sp. entre as coletas C1 e C2 ($p=0,031$), C1 e C6 ($p=0,07$), assim como, *Gemella morbillorum* entre C1 e C4 ($p=0,07$), *Peptostreptococcus* sp. entre C1 e C6 ($p=0,006$), C5 e C6 ($p=0,012$) e *Propionibacterium* sp. entre C1 e C4 ($p=0,039$).

A tabela 9 mostra os microrganismos presentes nas coletas iniciais C1, C4 e C5 de acordo com os medicamentos intracaneais utilizados. Com relação à coleta inicial, na maioria dos casos houve uma diminuição do número de espécies, porém isso nem sempre resultou em eliminação após o uso dos medicamentos intracaneais. Fato interessante é que nos casos positivos para a presença de microrganismos, estes nem sempre estavam presentes nas coletas anteriores.

A tabela 10 mostra as variações do número de espécies bacterianas encontradas nos 24 canais radiculares nas diferentes coletas. A coleta 1 foi a que apresentou maior número de espécies (soma geral: 81 espécies), após as instrumentações (Coletas C2 e C4) houve uma diminuição do número de espécies para 20 e 11, respectivamente. Entretanto, após 7 dias dos canais preenchidos com soro fisiológico houve um aumento no número de espécies (C3 e C6 apresentaram 41 espécies), o mesmo também ocorreu entre antes e após o uso das medicações intracanaís que subiu de 11 espécies (C4) para 30 espécies (C5).

A tabela 11 e Figura 6 mostram as variações das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) encontradas nos 24 canais radiculares nas diferentes coletas. A coleta 1 foi a que apresentou maior UFC/mL com números variando entre 4×10^2 e $2,7 \times 10^6$, após as instrumentações (Coletas C2 e C4) houve uma diminuição drástica desse número que variou entre 0 e 8×10^3 UFC/mL. Entretanto, após 7 dias dos canais preenchidos com soro fisiológico esse número voltou a aumentar, variando entre 0 e $1,2 \times 10^6$ UFC/mL (coletas C3 e C6). Após o uso dos medicamentos intracanaís era esperada uma diminuição no número das unidades formadoras de colônia, entretanto isso não ocorreu em todos os casos.

A tabela 12 e Figura 7 mostram a quantificação de endotoxinas antes e após os procedimentos. A quantidade inicial de endotoxinas variou entre 62,938 e 214,569 EU/mL. Após a primeira instrumentação esse número variou entre 3,88 a 172,856 UE/mL e após a segunda instrumentação entre 32,661 e 174,556 UE/mL. Após 7 dias do uso de medicação intracanal esses números variaram entre 7,508 e 192,267 UE/mL, de forma geral houve apenas uma pequena diminuição na quantidade de endotoxinas antes e após o uso das medicações intracanaís, e em alguns casos isolados houve um aumento desse número.

A Tabela 13 mostra a quantidade de UFC/mL e endotoxinas (UE/mL) presentes em 24 canais radiculares contendo polpa necrosada e lesões periapicais após a utilização de medicamentos intracanaís. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as medicações intracanaís testadas, tanto para a

quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), como para a quantidade de endotoxinas (UE/mL) (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

A Figura 8 mostra a porcentagem do do número de casos positivos m do número total de espécies, dos valores médios da quantidade de endotoxinas (UE/mL) e dos valores médios das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) na diferentes coletas. Com relação ao número de espécies, pode-se perceber que as maiores reduções ocorreram após as instrumentações (C2 com valor residual de 24,7% e C4 com 13,6%). Após 7 dias dos canais preenchidos com soro fisiológico essas porcentagens tornaram a aumentar com valores residuais de 50,6% (C3 e C6). Após a utilização da medicação intracanal houve um aumento estatisticamente significativo da coleta anterior ($p < 0,05$), passando de 13,6% na Coleta 4 para 37% na Coleta 5.

A quantidade de endotoxinas apresentou maior redução após a instrumentação, mantendo-se estatisticamente similar após a segunda instrumentação e 7 dias de medicação intracanal (Figura 7).

A porcentagem do número de unidades formadoras de colônia por mL diminuiu drasticamente após a primeira instrumentação (C2), com valores residuais de 0,1%, mantendo-se inferior a 1% após a segunda instrumentação (C4) e medicação intracanal (C5) (Figura 6).

Tabela 3 . Número de casos e microrganismos antes e após intervenções endodônticas

	C1 (inicial)	C2 (Após 1ª PQM)	C3 (7 dias com soro)	C4 (Após 2ª PQM)	C5 (Após medicação)	C6 (7 dias com soro)
Número total de casos	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)
casos positivos	24 (100%)	13 (54.1%)	21 (87.5%)	8 (33.3%)	13 (54.1%)	20 (83,3%)
casos negativos	0	11(45.8%)	3 (12,5%)	16 (66.6%)	11 (45.8%)	4 (16,7%)
Espécies diferentes por casos positivos*	Média: 3.3 (\pm 1.5) mediana: 4 (range 1-7)	Média: 1.5 (\pm 0.9) mediana: 1 (range 1-4)	Média: 1.9 (\pm 1.0) mediana: 4 (range 1-4)	Média: 1.3 (\pm 0.6) mediana: 1 (range 1-3)	Média: 2.3 (\pm 1.3) mediana: 2 (range 1-6)	Média: 2.0 (\pm 1.0) mediana: 2 (range 1-5)
Número total de microrganismos	81 (100%)	20(100%)	41(100%)	11 (100%)	30 (100%)	41(100%)**
Cocos Gram-positivos	12 (14.9%)	3 (15%)	12 (29,3%)	2 (18.2%)	6 (20%)	12 (29,3%)
Bacilos Gram- positivos	43 (53.1%)	12 (60%)	20 (48,8%)	6 (54.6%)	18 (60%)	21 (51,2%)
Cocos Gram- negativos	1 (1.2%)	1 (5%)	2 (4,9%)	0	4 (13.3%)	4 (9,7%)
Bacilos Gram-negativos	25 (30.8%)	4 (20%)	7 (17%)	3 (27.2%)	2 (6.7%)	3 (7,3%)
Número de Gram-positivos	55 (67.9%)	15 (75%)	32 (78%)	8 (72.7%)	24 (80%)	34 (82,9%)
Número de Gram-negativos	26 (32.1%)	5 (25%)	9 (22%)	3 (27.3%)	6 (20%)	6 (14,6%)
Número de facultativos	25 (30.9%)	3 (15%)	12 (29,3%)	3 (27.3%)	15 (50%)	15 (36,6%)
Número de anaeróbios	56 (69.1%)	17 (85%)	29 (70,7%)	8 (72.7%)	15 (50%)	25 (60,9%)

C1 (Coleta 1): realizada no início da primeira intervenção endodôntica (logo após abertura coronária); **C2** (Coleta 2): após a PQM; **C3** (Coleta 3): 7 dias após PQM (canal preenchido com soro fisiológico); **C4** (Coleta 4): após nova instrumentação; **C5** (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal; **C6** (Coleta 6): 7 dias após remoção da medicação intracanal (canal preenchido com soro fisiológico).

O número total de casos foi considerado como 100% para calcular a porcentagem de casos negativos e positivos, assim como o número total de microrganismos para calcular a porcentagem dos tipos morfológicos, Gram e condição gasosa.

* apenas os casos positivos foram utilizados para o cálculo das médias, desvio padrão (\pm), mediana e intervalo (range).

** Presença de um fungo.

Tabela 4. Coleta 5 dividida de acordo com as diferentes medicações intracanaís

	Ca(OH) ₂	CHX gel 2%	Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%
Número total de casos	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
casos positivos	5 (62.5%)	4 (50%)	4 (50%)
casos negativos	3 (37.5%)	4 (50%)	4 (50%)
Espécies diferentes por casos positivos*	média: 2 (\pm 0.8) mediana:2 (range 1-3)	média: 2.7 (\pm 1.9) mediana: 2 (range 1-6)	média: 2.2 (\pm 0.8) mediana:2.5 (range 1-3)
Número total de microrganismos	10 (100%)	11 (100%)	9 (100%)
Cocos Gram-positivos	1 (10%)	3 (27.3%)	2 (22.2%)
Bacilos Gram- positivos	7 (70%)	7 (63.6%)	4 (44.4%)
Cocos Gram- negativos	1 (10%)	0 (%)	3 (33.3%)
Bacilos Gram-negativos	1 (10%)	1 (9.1%)	0 (%)
Número de Gram-positivos	8 (80%)	10 (90.9%)	6 (66.6%)
Número de Gram-negativos	2 (20%)	1 (9.1%)	3 (33.3%)
Número de facultativos	4 (40%)	5 (45.5%)	6 (66.6%)
Número de anaeróbios	6 (60%)	6 (54.5%)	3 (33.3%)

C5 (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal

* apenas os casos positivos foram utilizados para o cálculo das médias, desvio padrão (\pm), mediana e intervalo (range).

Tabela 5. Distribuição dos microrganismos isolados nas diversas coletas durante o tratamento endodôntico de acordo com as características morfológicas

Microrganismos	C1	C2	C3	C4	C5	C6
cocos Gram-negativos						
<i>Neisseria</i> spp.					1	
<i>Neisseria subflava</i>					1	
<i>Veillonella</i> spp.	1		1		1	2
cocos Gram-positivos						
<i>Aerococcus viridans</i>						3
<i>Gemella morbillorum</i>	7		2	1	2	2
<i>Micrococcus</i> spp.	2				4	
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1	1	1			1
<i>Peptostreptococcus micros</i>		2	1	1		
<i>Peptostreptococcus prevotti</i>	1		5			2
<i>Streptococcus salivaris</i>			1			
<i>Streptococcus mitis</i>	1		2		1	1
<i>Streptococcus oralis</i>						1
<i>Streptococcus pneumoneae</i>						1
<i>Streptococcus sanguis</i>						1
<i>Staphylococcus xylosum</i>						1
Bacilos Gram-negativos						
<i>Bacteroides gracilis</i>	1					
<i>Bacteroides</i> spp.		1		1		
<i>Capnocytophaga</i> spp.	2		3	1	2	1
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1		1			
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4	1	4			1
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	1					
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	1					
<i>Haemophilus haemolysans</i>						1
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	2					
<i>Porphyromonas asaccharolitica</i>	1					
<i>Prevotella buccae</i>	1					
<i>Prevotella denticola</i>	1	1				
<i>Prevotella intermedia</i>	4		1			
<i>Prevotella loescheii</i>	2					
<i>Prevotella oralis</i>	3	1				

C1 (Coleta 1): realizada no início da primeira intervenção endodôntica (logo após abertura coronária); **C2** (Coleta 2): após a instrumentação; **C3** (Coleta 3): 7 dias após a instrumentação (canal preenchido com soro fisiológico); **C4** (Coleta 4): após nova instrumentação; **C5** (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal; **C6** (Coleta 6): 7 dias após remoção da medicação intracanal (canal preenchido com soro fisiológico).

Tabela 6. Distribuição dos microrganismos isolados nas diversas coletas durante o tratamento endodôntico de acordo com as características morfológicas (continuação Tabela 5)

Microrganismos	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Bacilos Gram-positivos						
<i>Actinomyces israeli</i>					1	
<i>Actinomyces meyeri</i>	2		1		1	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	6	2	1		2	2
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2			1	1	
<i>Actinomyces viscosus</i>	3		2		1	1
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1		1		1	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1		1	1		
<i>Clostridium argentinense</i>					3	
<i>Clostridium bifermentans</i>	1				2	
<i>Clostridium butyricum</i>	2	1				1
<i>Clostridium difficile</i>						1
<i>Clostridium sporogens</i>	1					
<i>Clostridium</i> spp.	4	1	2			1
<i>Clostridium paraputrypherum</i>		1	1			
<i>Clostridium acetobutyricum</i>			1			1
<i>Eubacterium faecium</i>			1			
<i>Eubacterium lentum</i>	6	1				
<i>Eubacterium limosum</i>	3		2			1
<i>Lactobacillus</i> spp.					1	1
<i>Lactobacillus lactis lactis</i>	1					1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		1	1	1		
<i>Listeria</i> spp.						1
<i>Propionibacterium acnes</i>	7	5	4	2	4	9
<i>Propionibacterium granulosum</i>						1
<i>Propionibacterium propionicum</i>	4	1	1	2	1	1
Fungos						
<i>Trichosporon</i>						1
Total microrganismos	81	20	41	11	30	41

C1 (Coleta 1): realizada no início da primeira intervenção endodôntica (logo após abertura coronária); **C2** (Coleta 2): após a instrumentação; **C3** (Coleta 3): 7 dias após a instrumentação (canal preenchido com soro fisiológico); **C4** (Coleta 4): após nova instrumentação; **C5** (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal; **C6** (Coleta 6): 7 dias após remoção da medicação intracanal (canal preenchido com soro fisiológico).

Tabela 7. Distribuição dos microrganismos, agrupados de acordo com o gênero, isolados nas diversas coletas durante o tratamento endodôntico de acordo com as características morfológicas

Microrganismos	C1	C2	C3	C4	C5	C6
cocos Gram-negativos						
<i>Neisseria</i> sp.					2	
<i>Veillonella</i> sp.	1		1		1	2
cocos Gram-positivos						
<i>Aerococcus</i> sp.						3
<i>Gemella</i> sp.	7		2	1	2	2
<i>Micrococcus</i> sp.	2				4	
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	2	3	7	1		1
<i>Streptococcus</i> sp.	1		3		1	4
<i>Staphylococcus</i> sp.						1
Bacilos Gram-negativos						
<i>Bacteroides</i> sp.	1	1		1		
<i>Capnocytophaga</i> sp.	2		3	1	2	1
<i>Fusobacterium</i> sp.	5	1	5			1
<i>Haemophilus</i> sp.	2					1
<i>Porphyromonas</i> sp.	3					
<i>Prevotella</i> sp.	11	2	1			
Bacilos Gram-positivos						
<i>Actinomyces</i> sp.	13	2	4	1	6	3
<i>Bifidobacterium</i> sp.	2		2	1	1	
<i>Clostridium</i> sp.	8	3	4		5	4
<i>Eubacterium</i> sp.	9	1	3			2
<i>Lactobacillus</i> sp.	1	1	1	1	1	1
<i>Listeria</i> sp.						1
<i>Propionibacterium</i> sp.	11	6	5	4	5	11
Fungos						
<i>Tryclossporun</i>						1
Total microrganismos	81	20	41	11	30	41

C1 (Coleta 1): realizada no início da primeira intervenção endodôntica (logo após abertura coronária); **C2** (Coleta 2): após a instrumentação; **C3** (Coleta 3): 7 dias após a instrumentação (canal preenchido com soro fisiológico); **C4** (Coleta 4): após nova instrumentação; **C5** (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal; **C6** (Coleta 6): 7 dias após remoção da medicação intracanal (canal preenchido com soro fisiológico).

Tabela 8. Distribuição dos microrganismos da Coleta 5 divididos de acordo com os medicamentos utilizados

	Ca(OH) ₂	CHX gel 2%	Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%
Cocos Gram-positivos			
<i>Aerococcus viridans</i>	1		1
<i>Gemella morbillorum</i>		2	2
<i>Peptostreptococcus prevotti</i>		1	
Cocos Gram-negativos			
<i>Neisseria</i> spp.	1		
<i>Neisseria subflava</i>			1
<i>Veillonella</i> spp.			1
Bacilos Gram-negativos			
<i>Capnocytophaga</i> spp.	1	1	
Bacilos Gram-positivos			
<i>Actinomyces israelii</i>		1	
<i>Actinomyces meyeri</i>	1		1
<i>Actinomyces naeslundii</i>		1	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		1	
<i>Actinomyces viscosus</i>	1		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1	1	
<i>Clostridium argentinense</i>	1	2	
<i>Lactobacillus</i> spp.			1
<i>Propionibacterium propionicum</i>	1		
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	1	1
Total	10	11	9

C5 (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal

Tabela 9. Microbiota encontrada nos canais radiculares na coleta inicial (C1), antes (C4) e após (C5) remoção da medicação intracanal

Ca(OH)2				CHX gel 2%				Ca(OH)2 + CHX gel 2%			
caso	C1	C4	C5	caso	C1	C4	C5	caso	C1	C4	C5
3	<i>G. morbillorum</i> <i>E. lentum</i> <i>P. acnes</i> <i>B. gracilis</i> <i>F. nucleatum</i>	-	-	1	<i>P. propionicum</i> <i>A. meyeri</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. acnes</i>	-	-	2	<i>E. lentum</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. propionicum</i> <i>F. nucleatum</i> <i>A. odontolyticus</i>	-	<i>N. subflava</i> <i>A. meyeri</i> <i>A. viridans</i>
8	<i>F. nucleatum</i> <i>P. magnus</i> <i>G. morbillorum</i> <i>C. tyrobutirium</i> <i>A. naeslundii</i>	<i>B. ureolyticus</i>	<i>A. viridans</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>A. meyeri</i>	5	<i>E. lentum</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. acnes</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>H. aphrophylus</i>	-	-	4	<i>G. morbillorum</i> <i>S. mitis</i> <i>A. naeslundii</i> <i>A. viscosus</i>	-	-
10	<i>P. oralis</i> <i>P. denticola</i>	-	<i>A. viscosus</i>	6	<i>L. lactis lactis</i> <i>A. viscosus</i>	<i>P. acnes</i>	<i>A. naeslundii</i>	9	<i>P. intermedia</i> <i>A. viscosus</i> <i>C. sporogens</i> <i>G. morbillorum</i>	-	<i>Veillonella spp.</i> <i>A. naeslundii</i> <i>G. morbillorum</i>
11	<i>P. propionicum</i> <i>A. naeslundii</i>	-	-	7	<i>P. oralis</i> <i>H. haemolyticus</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>P. acnes</i> <i>P. loeschii</i>	-	<i>A. israeli</i> <i>C. argentinense</i> <i>P. acnes</i> <i>P. prevotti</i> <i>G. morbillorum</i> <i>A. odontolyticus</i>	12	<i>P. loescheii</i> <i>F. necrophorum</i> <i>P. buccae</i> <i>P. acnes</i>	-	-
14	<i>P. prevotti</i> <i>E. lentum</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i>	-	-	13	<i>A. odontolyticus</i>	-	<i>G. morbillorum</i> <i>C. argentinense</i>	15	<i>E. lentum</i> <i>Veillonella spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>E. limosum</i>	-	-
18	<i>A. naeslundii</i> <i>P. oralis</i> <i>P. acnes</i> <i>C. tyrobutyricum</i> <i>E. limosum</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i>	<i>P. propionicum</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>P. propionicum</i> <i>Capnocytophaga spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	16	<i>G. morbillorum</i> <i>A. naeslundii</i>	-	-	17	<i>E. lentum</i> <i>B. adolescentis</i> <i>A. meyeri</i> <i>A. naeslundii</i>	<i>P. micros</i> <i>P. propionicum</i> <i>A. odontolyticus</i>	<i>P. acnes</i>
20	<i>Clostridium spp</i> <i>Capnocytophaga spp</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>P. acnes</i>	19	<i>Clostridium spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>P. acnes</i>	<i>Capnocytophaga spp</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	21	<i>Capnocytophaga spp</i>	<i>Capnocytophaga spp</i>	-
23	<i>P. acnes</i> <i>Clostridium spp.</i>	-	<i>P. acnes</i> <i>C. argentinense</i>	22	<i>E. limosum</i> <i>C. bifementans</i>	-	-	24	<i>P. acnes</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. asaccharolitica</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>G. morbillorum</i> <i>Lactobacillus spp</i>

C1(Coleta 1): inicial; C4 (Coleta 4): após nova instrumentação; C5 (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal

Tabela 10. Número total de espécies bacterianas encontradas em 24 canais radiculares em diferentes coletas, medianas e porcentagem em relação à soma das coletas iniciais

Coletas	C1	C2	C3	C4	C5	C6
* Medicamentos intracanaís						
Ca(OH) ₂	5	0	4	0	0	2
	5	2	1	1	3	0
	2	1	1	0	1	0
	2	0	1	0	0	3
	4	0	2	0	0	1
	7	3	4	2	3	2
	2	2	3	1	1	2
	2	0	0	0	2	3
Soma	29 (100%)	8 (27,58%)	16 (55,17%)	4 (13,79%)	10 (34,48%)	13 (44,82%)
CHX gel 2%	4	1	1	0	0	0
	5	1	2	0	0	3
	2	0	3	1	1	3
	5	1	2	0	6	0
	1	0	0	0	2	1
	2	1	0	0	0	1
	2	1	2	1	2	3
	2	0	1	0	0	1
Soma	23 (100%)	5 (21,73%)	11 (47,8%)	2 (8,69%)	11 (47,82%)	12 (52,17%)
Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%	5	0	1	0	3	5
	4	0	2	0	0	2
	4	0	2	0	3	1
	4	0	1	0	0	1
	4	1	1	0	0	1
	4	4	2	3	1	1
	1	1	2	1	0	3
	3	1	3	1	2	2
Soma	29 (100%)	7 (24,13%)	14 (48,27%)	5 (17,24%)	9 (31,03%)	16 (50,61%)
Soma geral	81 (100%)	20 (24,69%)	41 (50,61%)	11 (13,58%)	30 (37,03%)	41 (50,61%)

* Divisão em grupos de acordo com a medicação intracanal colocada após coleta C4.

C1 (Coleta 1): realizada no início da primeira intervenção endodôntica (logo após abertura coronária; **C2** (Coleta 2): após a instrumentação; **C3** (Coleta 3): 7 dias após a instrumentação (canal preenchido com soro fisiológico); **C4** (Coleta 4): após nova instrumentação; **C5** (Coleta 5): 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal; **C6** (Coleta 6): 7 dias após remoção da medicação intracanal (canal preenchido com soro fisiológico).

Tabela 11. Número total de UFC/mL encontradas em 24 canais radiculares em diferentes coletas, medianas e porcentagem em relação à mediana das coletas iniciais

Coletas *Medicamentos intracanaís	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Ca(OH) ₂	$1,0 \times 10^6$	0	$7,0 \times 10^3$	0	0	$1,2 \times 10^3$
	$7,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	0
	$3,7 \times 10^5$	$6,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$	0	$6,0 \times 10^2$	0
	$6,0 \times 10^4$	0	$2,0 \times 10^4$	0	0	$6,0 \times 10^3$
	$1,5 \times 10^5$	0	$4,0 \times 10^2$	0	0	$4,0 \times 10^3$
	$5,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^6$	$7,4 \times 10^2$	$7,2 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$
	$2,7 \times 10^6$	$1,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$2,6 \times 10^3$
	$3,0 \times 10^4$	0	0	0	$2,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$
Mediana	$2,6 \times 10^5$ (100%)	$7,0 \times 10^2$ (0, 27%)	$1,3 \times 10^4$ (5%)	0 (0,00%)	$3, \times 10^1$ (3,85%)	$3,3 \times 10^3$ (1,20%)
CHX gel 2%	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	0	0	0
	$7,6 \times 10^5$	$4,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	0	0	$1,2 \times 10^3$
	$9,6 \times 10^4$	0	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^4$
	$4,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	0	$2,1 \times 10^3$	0
	$3,0 \times 10^6$	0	0	0	$9,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
	$1,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$	0	0	0	$2,0 \times 10^1$
	$4,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^3$	$4,7 \times 10^4$
	$4,6 \times 10^4$	0	$2,0 \times 10^3$	0	0	$2,0 \times 10^1$
Mediana	$4,5 \times 10^4$ (100%)	$3,0 \times 10^1$ (0,06%)	$2,0 \times 10^3$ (0,44%)	0 (0,00%)	$4,5 \times 10^2$ (1,00%)	$1,1 \times 10^2$ (0,24%)
Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%	$4,4 \times 10^5$	0	$9,6 \times 10^2$	0	$1,0 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$
	$2,5 \times 10^4$	0	$2,0 \times 10^3$	0	0	$3,6 \times 10^3$
	$2,5 \times 10^4$	0	$2,0 \times 10^5$	0	$2,8 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$
	$2,6 \times 10^5$	0	$8,0 \times 10^1$	0	0	$4,0 \times 10^1$
	$8,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^3$	0	0	$2,0 \times 10^1$
	$1,9 \times 10^3$	$4,9 \times 10^2$	$6,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^2$	0	$5,3 \times 10^4$
	$1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$
Mediana	$2,5 \times 10^4$ (100%)	$1,0 \times 10^1$ (0,04%)	$2,5 \times 10^3$ (10,0%)	0 (0,00%)	$2,0 \times 10^1$ (0,08%)	$1,5 \times 10^2$ (1,48%)
Mediana geral	$5,3 \times 10^4$ (100%)	$2,0 \times 10^1$ (0,03%)	$3,0 \times 10^3$ (0,56%)	0 (0%)	$3,0 \times 10^1$ (0,06%)	$3,7 \times 10^2$ (0,69%)

* Divisão em grupos de acordo com a medicação intracanal colocada após coleta C4. **C1:** logo após abertura coronária; **C2:** após a instrumentação; **C3:** 7 dias após a instrumentação; **C4:** após nova instrumentação; **C5:** 7 dias, logo após a remoção da medicação intracanal; **C6:** 7 dias após remoção da medicação intracanal

Tabela 12. Quantificação de endotoxinas (UE/mL) antes e após procedimentos endodônticos

Coletas	C1	C2	C4	C5
* Medicamentos intracanais				
Ca(OH) ₂	214,569	53,031	26,433	77,878
	149,95	36,69	93,616	192,267
	206,265	47,07	138,086	67,631
	201,643	74,462	97,233	221,4
	165,565	165,563	71,762	57,151
	171,363	35,256	116,688	93,333
	173,608	146,412	108,922	101,501
	141,107	22,938	32,661	35,581
Mediana	172,4855 (100%)	50,0505 (28,97%)	95,4245 (55,32%)	85,6055 (49,63%)
CHX gel 2%	187,847	45,932	108,283	95,291
	124,96	54,303	67,028	102,993
	154,973	47,003	53,701	149,405
	116,052	22,291	60,465	63,546
	171,583	51,284	69,173	38,456
	179,568	172,856	148,153	12,57
	124,887	108,854	120,484	177,835
	135,351	39,669	91,237	56,874
Mediana	145,162 (100%)	52,7935 (36,86%)	80,205 (55,25%)	79,4185 (54,71%)
Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%	71,917	62,072	33,542	34,145
	145,128	40,306	48,008	44,325
	138,363	30,768	23,488	41,509
	122,573	73,0411	174,556	21,659
	144,329	117,48	158,45	173,291
	172,162	85,887	55,483	52,894
	162,08	3,88	84,187	7,508
	62,938	56,29	41,735	51,888
Mediana	141,346 (100%)	59,181 (41,86%)	51,7455 (36,60%)	42,917 (30,36%)
Mediana geral	152,4615 (100%)	53,6670 (35,20%)	84,9310 (55,70%)	72,7545 (47,71%)
Média geral	151,6158 (100%)	66,3899 (43,78%)	84,3072 (55,60%)	82,1221 (54,16%)

Os testes de quantificação de endotoxinas foram realizados apenas nas coletas: C1, C2, C4 e C5.

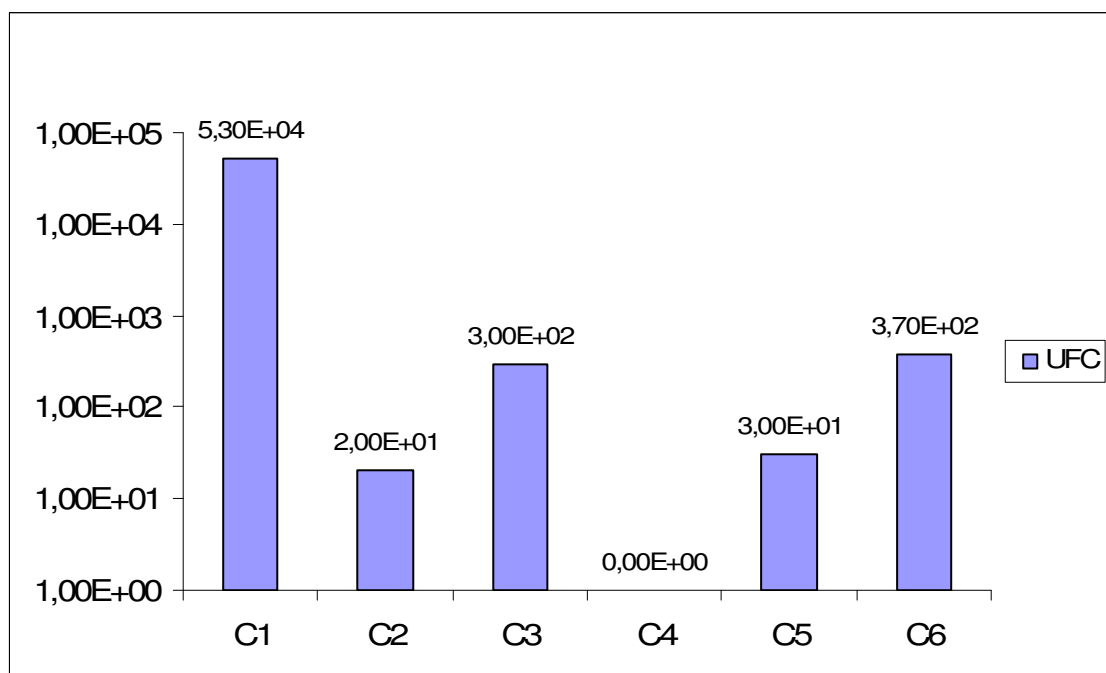


Figura 6. Número total de UFC por mL (valores medianos) encontradas em 24 canais radiculares em diferentes coletas

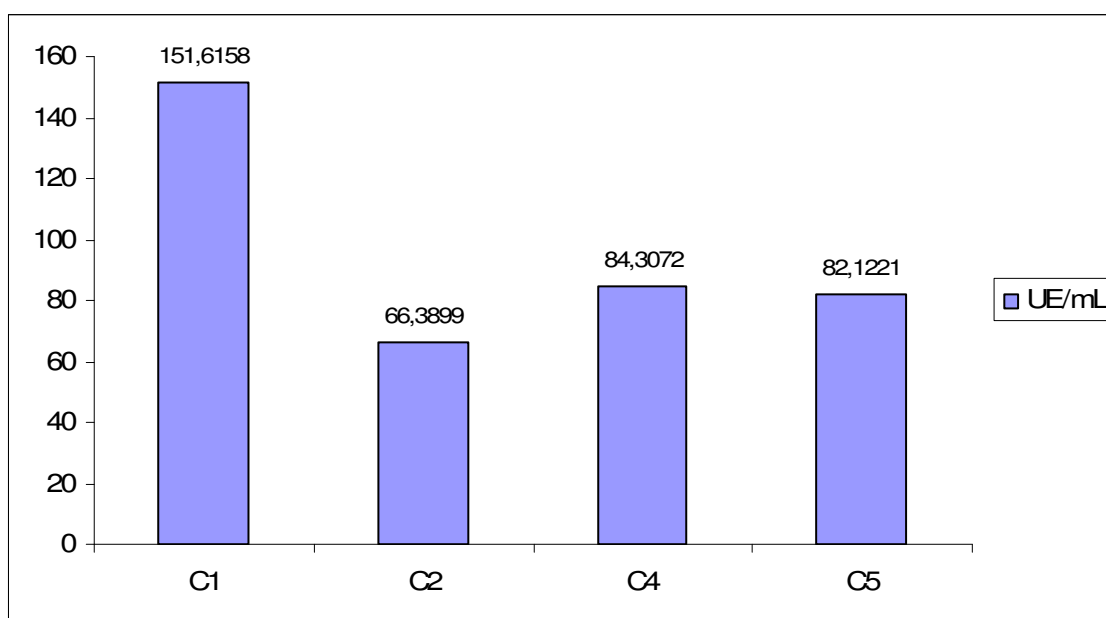


Figura 7. Quantificação de endotoxinas (UE/mL, valores médios) antes e após procedimentos endodônticos.

Tabela 13. Quantidade de UFC/ml e endotoxinas (UE/ml) presentes em 24 canais radiculares contendo polpa necrosada e lesões periapicais após a utilização de medicamentos intracanais (Coleta 5)

	Ca(OH) ₂		CHX		Ca(OH) ₂ + CHX	
	mediana (range –)	Média (desvio padrão)	mediana (range –)	Média (desvio padrão)	mediana (range –)	Média (desvio padrão)
UFC	10 (0 – 7.2 x 10 ²)	2.0 x 10 ² (± 2.8 x 10 ²)	4.5 x 10 ² (0 – 8 x 10 ³)	1.5 x 10 ³ (± 2.5 x 10 ³)	20 (0 – 3.6 x 10 ²)	9.7 x 10 ¹ (± 1.3 x 10 ²)
Endotoxina	85.60 (35.58 – 192.26)	105.84 (± 61.79)	79.41 (12.57 – 177.83)	87.12 (± 52.23)	42.91 (7.5 – 173.29)	53.40 (± 47.54)

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as diferentes medicações intracanais, tanto para a quantidade de UFC/ml, como para a quantidade de endotoxinas (UE/ml). Teste de Kruskal-Wallis (p<0,05)

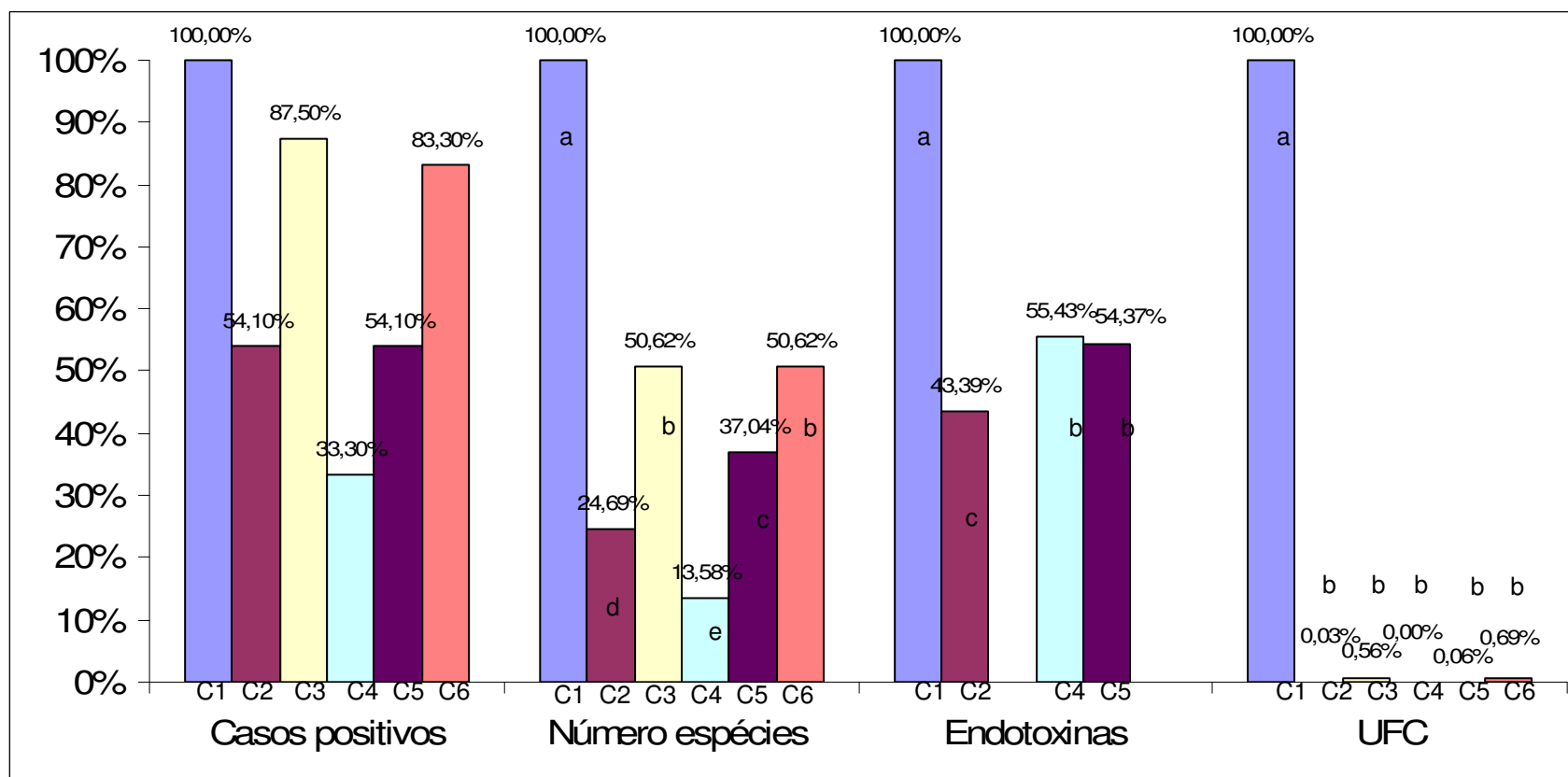


Figura 8. Porcentagem de casos positivos para cultura, porcentagem do número total de espécies, valores médios da quantidade de endotoxinas (UE/mL) e valores medianos das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) antes e após procedimentos endodônticos. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre as coletas (Teste de Friedman, $p < 0,05$; complementado pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$). Os testes de quantificação de endotoxinas foram realizados apenas nas coletas: C1, C2, C4 e C5.

5.3. EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS ISOLADOS DOS CANAIS RADICULARES

Foram testadas as susceptibilidades antimicrobianas dos seguintes microrganismos: *Fusobacterium nucleatum* (n=9), *Fusobacterium necrophorum* (n=2), *Propionibacterium acnes* (n=30), *Peptostreptococcus magnus* (n=5), *Peptostreptococcus micros* (n=5), *Peptostreptococcus prevotti* (n=8), *Prophyromonas endodontalis* (n=2), *Prophyromonas asaccharolitica* (n=1), *Propionibacterium acnes* (n=30), *Propionibacterium granulosum* (n=1), *Propionibacterium propionicum* (n=10), *Prevotella buccae* (n=1), *Prevotella denticola* (n=1), *Prevotella intermedia* (n=5), *Prevotella loescheii* (n=2) e *Prevotella oralis* (n=4), provenientes de diferentes coletas.

Os valores das CIM₅₀ e CIM₉₀ se referem às concentrações inibitórias mínimas efetivas contra 50% e 90% dos isolados clínicos testados. Para tal foi utilizado o índice de susceptibilidade de acordo com as concentrações inibitórias mínimas determinadas reportadas por Kuriyama *et al.* (2000), Jacinto *et al.* (2003) e van Winkenhoff *et al.* (2004).

Os resultados qualitativos foram definidos pelas concentrações inibitórias conhecidas (“breakpoint”). Quando os valores obtidos pelo E-test foram inferiores aos do breakpoint os microrganismos foram considerados suscetíveis. Por outro lado, os isolados que apresentaram valores iguais ou superiores ao do breakpoint foram considerados resistentes. Os valores pré-definidos (breakpoints) são: amoxicilina 3 µg/mL, amoxicilina + ácido clavulânico 3,0 + 0,5 µg/mL, azitromicina 2 µg/mL, benzilpenicilina 0,5 µg/mL, clindamicina 4 µg/mL, cefaclor 4 µg/mL, eritromicina 16 µg/mL e metronidazol 8 µg/mL.

A maioria dos microrganismos foi suscetível a maior parte dos antibióticos testados, 44% dos *Fusobacterium nucleatum* mostraram ser resistentes à eritromicina. Cinquenta por cento dos *Fusobacterium necrophorum* também mostraram ser resistentes aos agentes antimicrobianos: benzilpenicilina, clindamicina e eritromicina. Vinte por cento dos *Peptostreptococcus micros* mostraram ser resistentes ao metronidazol (Tabela 14).

Quarenta por cento dos isolados clínicos de *Prevotella intermedia* mostraram resistência à benzilpenicilina e ao metronidazol e 20% à clindamicina. Enquanto que

25% das *Prevotella oralis* mostraram resistência à benzilpenicilina e clindamicina (Tabela 15).

Todos isolados clínicos de *Porphyromonas* mostraram ser sensíveis aos agentes antimicrobianos testados. Dez por cento dos isolados clínicos de *Propionibacterium acnes* mostraram resistência à azitromicina, clindamicina; 20% para cefaclor e eritromicina e 100% para metronidazol. Cem por cento dos isolados clínicos de *Propionibacterium granulosum* também se mostraram resistentes à eritromicina e ao metronidazol. Assim como, 100% dos *Propionibacterium propionicum* mostraram-se resistentes ao metronidazol (Tabela 16).

Tabela 14. Valores médios MIC50 e MIC90 em µg/mL de microrganismos isolados de canais radiculares com lesões periapicais

	Amoxicillina (3 µg/mL)	Amoxicillina + ácido clavulânico (3,0+ 0,5 µg/mL)	Azitromicina (2 µg/mL)	Benzilpenicilina (0,5 µg/mL)	Clindamicina (4 µg/mL)	Cefaclor (16 µg/mL)	Eritromicina (4 µg/mL)	Metronidazol (8 µg/mL)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n=9)								
Range	0,016-1,5	0,016-2,0	0,016-0,32	0,016-6,0	0,23-16	0,016-0,75	0,016-16	0,016-0,023
MIC50	0,016	0,023	0,016	0,016	0,23	0,38	0,19	0,016
MIC90	1,5	0,094	0,016	0,016	0,23-16	0,5	16	0,016
Susctibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	56%	100%	56%	100%
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=2)								
Range	0,023	0,016-0,75	0,016-0,32	0,016-6	0,23-16	0,19-3,0	0,38-8	0,016-0,032
MIC50	0,023	0,016	0,016	0,016	0,23	0,19	0,38	0,016
MIC90	0,023	0,75	0,32	6	16	3,0	8	0,032
Susctibility rate(%)	100%	100%	100%	50%	50%	100%	50%	100%
<i>Peptostreptococcus magnus</i> (n=5)								
Range	0,016-0,25	0,125-0,19	0,047-8,0	0,016-0,38	0,016-1,5	0,047-1,0	0,016-1,5	0,016-1,0
MIC50	0,032	0,125	0,047	0,016	0,016	0,047	0,016	0,125
MIC90	0,25	0,19	1,0	0,016	0,125	1,0	1,5	1,0
Susctibility rate(%)	100%	100%	80%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Peptostreptococcus micros</i> (n=5)								
Range	0,016-0,25	0,125-0,19	0,75-1,0	0,016-0,38	0,016-1,5	0,032-1,0	0,016-1,5	0,016-256
MIC50	0,047	0,125	0,047	0,016	0,016	0,047	0,016	0,125
MIC90	0,25	0,19	1,0	0,016	0,125	1,0	1,5	1,0
Susctibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	80%
<i>Peptostreptococcus prevotti</i> (n=8)								
Range	0,016-0,5	0,125-0,19	0,047-1,5	0,016-0,38	0,016-1,5	0,047-1,0	0,016-64	0,125-256
MIC50	0,032	0,125	0,047	0,016	0,016	0,047	0,016	0,125
MIC90	0,5	0,19	1,0	0,38	0,125	1,0	1,0	1,0
Susctibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	87,5%	87,5%

“Breakpont” entre parenteses

Tabela 15. Valores médios MIC50 e MIC90 em µg/mL de microrganismos isolados de canais radiculares com lesões periapicais

	Amoxicilina (3 µg/mL)	Amoxicilina + ácido clavulânico (3,0+ 0,5 µg/mL)	Azitromicina (2 µg/mL)	Benzilpenicilina (0,5 µg/mL)	Clindamicina (4 µg/mL)	Cefaclor (16 µg/mL)	Eritromicina (4 µg/mL)	Metronidazol (8 µg/mL)
<i>Prevotella buccae</i> (n=1)								
Range	0,016	0,19	0,094	0,016	0,016	0,016	0,38	0,016
MIC50	0,016	0,19	0,094	0,016	0,016	0,016	0,38	0,016
MIC90	0,016	0,19	0,094	0,016	0,016	0,016	0,38	0,016
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Prevotella denticola</i> (n=1)								
Range	0,016	0,016	0,016	0,016	0,125	0,016	1,5	0,016
MIC50	0,016	0,016	0,016	0,016	0,125	0,016	1,5	0,016
MIC90	0,016	0,016	0,016	0,016	0,125	0,016	1,5	0,016
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Prevotella intermedia</i> (n=5)								
Range	0,016-3,0	0,016-2,0	0,016-2	0,016-6,0	0,125-24	0,032-3,0	0,125-1,5	0,016-16
MIC50	1,5	0,016	0,125	0,016	0,125	0,25	0,047	0,016
MIC90	3,0	0,75	2	1,5	0,38	2,0	1,5	8
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	60%	80%	100%	100%	60%
<i>Prevotella loescheii</i> (n=2)								
Range	0,016-1,5	0,016-2,0	0,016-0,32	0,19	0,125	0,19	0,125	0,25
MIC50	0,016	0,016	0,016	0,19	0,125	0,19	0,125	0,25
MIC90	1,5	2,0	0,32	0,19	0,125	0,19	0,125	0,25
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Prevotella oralis</i> (n=4)								
Range	0,016-1,5	0,016-2,0	0,016-0,32	0,016-6,0	0,125-24	0,047-3,0	0,125-1,5	0,016-8
MIC50	0,016	0,016	0,016	0,016	0,125	0,047	0,125	0,016
MIC90	1,5	0,032	0,016	0,023	0,125	0,125	0,75	0,016
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	75%	75%	100%	100%	100%

“Breakpont” entre parenteses

Tabela 16. Valores médios MIC50 e MIC90 em µg/mL de microrganismos isolados de canais radiculares com lesões periapicais

	Amoxicilina (3 µg/mL)	Amoxicilina + ácido clavulânico (3,0+ 0,5 µg/mL)	Azitromicina (2 µg/mL)	Benzilpenicilina (0,5 µg/mL)	Clindamicina (4 µg/mL)	Cefaclor (16 µg/mL)	Eritromicina (4 µg/mL)	Metronidazol (8 µg/mL)
<i>Porphyromonas endodontalis</i> (n=2)								
Range	0,016	0,016	0,016	0,016	0,125	0,016	1,5	0,016
MIC50	0,016	0,016	0,016	0,016	0,125	0,016	1,5	0,016
MIC90	0,016	0,016	0,016	0,016	0,125	0,016	1,5	0,016
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Porphyromonas ascccharolitica</i> (n=1)								
Range	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
MIC50	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
MIC90	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Propionibacterium acnes</i> (n=30)								
Range	0,016-1,5	0,016-2,0	0,016-24	0,016-0,75	0,016-192	0,016-4,0	0,023-12	32-256
MIC50	0,64	0,19	0,94	0,094	0,125	0,38	0,19	256
MIC90	1,0	0,75	1,0	0,25	1,5	1,0	0,25	256
Susceptibility rate(%)	100%	100%	90%	100%	90%	80%	80%	0%
<i>Propionibacterium granulosum</i> (n=1)								
Range	0,5	0,75	0,38	0,25	0,25	0,75	6	256
MIC50	0,5	0,75	0,38	0,25	0,25	0,75	6	256
MIC90	0,5	0,75	0,38	0,25	0,25	0,75	6	256
Susceptibility rate(%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
<i>Propionibacterium propionicum</i> (n=10)								
Range	0,016-1,0	0,016-0,75	0,016-32	0,016-4,0	0,016-192	0,047-1,0	0,032-6	256
MIC50	0,047	0,125	0,32	0,032	0,023	0,047	0,032	256
MIC90	0,38	0,75	1,0	0,19	0,125	0,25	0,38	256
Susceptibility rate(%)	100%	100%	80%	90%	90%	90%	90%	0%

“Breakpont” entre parenteses

6. DISCUSSÃO

6.1. MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES E EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS E SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS

6.1.1. MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES

Nos canais radiculares analisados, houve em média 3,3 espécies por canal, o que sustenta a afirmação de que as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas (Sundqvist, 1976; Yoshida *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 1994a, 1996a; Jacinto *et al.*, 2003).

Dentre as espécies bacterianas isoladas neste estudo, houve uma predominância de anaeróbios estritos, correspondendo a cerca de 69,1% do total de isolados microbianos, resultado este de acordo com Sundqvist (1976), Byström & Sundqvist (1983), Baumgartner & Falkler (1991) e Gomes *et al.* (1996 a). Apesar do grande número de espécies anaeróbias isoladas, é possível que algumas espécies muito sensíveis à presença de oxigênio não tenham sido identificadas, mesmo com todos os cuidados tomados durante a execução do método. As amostras foram inoculadas em meio de transporte apropriado e, em seguida, em meios de cultura pré-reduzidos altamente nutritivos. Estes foram prontamente incubados por tempo prolongado sob condições gasosas adequadas, para evitar a perda de microrganismos de crescimento lento.

O uso de meios de transporte preserva a viabilidade microbiana, inclusive dos anaeróbios, impedindo porém, sua proliferação (Gomes, 1995). Esta propriedade é importante, pois além de permitir contagem fiel do número de células presentes no material clínico, impede que espécies facultativas proliferem excessivamente, mascarando o crescimento, muito mais lento de anaeróbios. O meio de transporte utilizado neste estudo, o “Reduced Transport Fluid” (RTF), é eficiente em manter a viabilidade das células bacterianas e impedir a sua

proliferação por até 24 horas em temperatura ambiente (van Steenberg *et al.*, 1982).

Entretanto, era de se esperar que os meios empregados não fossem apropriados para o crescimento de todos os tipos de microrganismos. Espiroquetas e micoplasmas não sobrevivem nos meios usados neste estudo e, de fato, não foram isolados, assim como *Bacteroides forsythus* e *Tanarella forsythens*, microrganismos difíceis de serem cultivados. Até o presente momento, não existe um único método que seja capaz de isolar todos os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares. Desta maneira, testes bacteriológicos devem ser usados conjuntamente com testes imunológicos (i.e. ELISA, “slot blot”, imunofluorescência indireta), sondas de DNA, reação de polimerase em cadeia (PCR), DNA-chip (Microarrays) para detectar uma maior gama de espécies bacterianas (Vianna *et al.*, 2005 b). Contudo não podemos esquecer que, até o momento, a cultura é a única técnica que pode diferenciar células viáveis de células mortas, sendo um método útil, pois casos que não respondem ao tratamento podem se beneficiar de uma investigação microbiológica, onde poderá também ser avaliada a susceptibilidade microbiana aos antibióticos ou agentes quimioterapêuticos (Gomes, 1995).

Certas espécies de bactérias anaeróbias estritas, principalmente bacilos produtores de pigmento negro (*Porphyromonas* sp. e *Prevotella* sp.) têm sido associadas a sinais e sintomas de origem endodôntica como dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação, edema e presença de exsudato (Gomes 1995; Gomes *et al.*, 1996 a,b; Baumgartner *et al.*, 1999; Jacinto *et al.*, 2003). Apesar dos casos selecionados para o presente estudo serem assintomáticos a prevalência de bacilos produtores de pigmento negro também foi investigada. Um total de 9 cepas foram isoladas, sendo que foram encontradas 4 cepas de *Prevotella intermedia*, 2 cepas de *Prevotella loescheii*, 1 cepa de *Prevotella denticola* e 2 de *Porphyromonas gingivalis*.

No presente estudo houve uma predominância microrganismos Gram-positivos, resultado este de acordo com Peters *et al.* (2002) que encontraram

microrganismos Gram-positivos em 56% dos casos. Entretanto, outros estudos (Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 1994) verificaram a predominância de Gram-negativos em infecções endodônticas primárias sintomáticas e assintomáticas. Os dentes utilizados no presente estudo não possuíam comunicação (visual) com a cavidade oral, segundo Gomes (2002) a presença ou ausência de restaurações, pode influenciar nos resultados microbiológicos.

6.1.2. EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS LOCAIS SOBRE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS

O presente estudo mostra que o preparo mecânico associado à clorexidina gel 2% utilizada como substância auxiliar foi capaz de reduzir drasticamente o número de unidades formadoras de colônia. Além disso, cinquenta por cento dos canais radiculares estavam livres de microrganismos após o preparo químico-mecânico na primeira sessão de atendimento, resultados estes de acordo com Vianna *et al.* (2006).

Sjögren *et al.* (1991; 1987) realizaram o preparo dos canais radiculares utilizando hipoclorito de sódio 0,5% e encontraram culturas negativas entre 50 e 60% após a instrumentação. Peters *et al.* (2002) realizaram o preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio 2% e 76% dos canais apresentaram culturas negativas. Vianna *et al.* (2006) realizaram o preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio 2,5% e 75% dos canais apresentaram culturas negativas. A diferença entre resultados pode ser explicada devido às diferentes substâncias utilizadas nos preparos dos canais radiculares e também devido a susceptibilidades do microrganismos envolvidos.

Entretanto, o não crescimento de microrganismos logo após a instrumentação não significa esterilidade do canal radicular, pois microrganismos remanescentes podem voltar a colonizar o canal principal, para avaliar a “esterilidade” do canal, estes foram preenchidos com soro fisiológico por 7 dias e o acesso coronário selado com resina após a instrumentação e após o uso da medicação intracanal. Peters *et al.* (2002) realizaram procedimento semelhante,

deixando os canais vazios após o preparo químico mecânico com hipoclorito de sódio 2%. Os autores verificaram que sem a utilização de uma medicação intracanal entre sessões, os microrganismos voltam a colonizar o canal principal e muitas vezes em números de UFC similares ou superiores aos iniciais. No presente estudo, a maioria dos casos não se apresentou estéril, pois os microrganismos voltaram a colonizar o canal principal. Os níveis de colonização dos canais preenchidos 7 dias com soro fisiológico [após a instrumentação (C3) ou após o uso de medicação intracanal (C6)] não atingiram o número de UFC da coleta inicial como relatado por Peters *et al.* (2002). Fato este que pode ser explicado devido ao efeito residual da clorexidina, a qual provavelmente retardou a colonização do canal principal. Os resultados do presente estudo em comparação o de Peters *et al.* (2002), sugerem que há uma ação residual da clorexidina após a instrumentação, mesmo quando esta foi removida do canal. Esse resultado também concorda com o resultado dos estudos de Heling *et al.* (1992), Jeansonne & White (1994), White *et al.* (1997), Leonardo *et al.* (1999) e Dametto *et al.*, (2005) que avaliaram a ação residual da clorexidina. Entretanto, é importante ressaltar que quando os canais estavam preenchidos com soro fisiológico houve crescimento microbiano, sendo assim, não é recomendado deixar canais vazios entre sessões de atendimento.

Comparando a primeira e a segunda instrumentações pode-se notar que após a segunda instrumentação o número de casos negativos para cultura aumentou de 10 para 16 casos (66.6%). Isto pode ser devido ao tempo de 7 dias não ser suficiente para uma contaminação microbiana em níveis profundos de dentina. Haapasalo & Ørstavik (1987) mostram em um estudo *in vitro* que é necessário um tempo maior que 7 dias para que haja uma completa contaminação dos túbulos dentinários. Um tempo de infecção prolongado leva a uma maior quantidade de túbulos infectados, considerando que a profundidade média de penetração bacteriana aumenta vagarosamente com o tempo. O aumento do número de casos negativos para a cultura, sugerem que não houve tempo hábil para uma completa recontaminação dos túbulos em 7 dias, sendo possível

eliminar maior número de microrganismos dos canais radiculares levando a culturas negativas, pois provavelmente estes já haviam sido reduzidos no primeiro preparo químico-mecânico.

A eficácia do preparo químico-mecânico foi determinada por vários estudos, nos quais a avaliação da redução microbiana antes e após o preparo químico-mecânico foi verificada pelo número de UFC/mL. As amostras iniciais mostraram valores de UFC/mL variando entre 6.5×10^3 (Bystrom & Sundqvist, 1985) e 1×10^5 (Bystrom & Sundqvist, 1981; Orstavik *et al.*, 1991; Sjogren *et al.*, 1991; Peters *et al.*, 2002) dependendo do estado de degradação da polpa e da presença ou ausência de tratamento endodôntico (infecções primárias ou secundárias). O número de microrganismos após o preparo químico-mecânico variou entre 0 e 10^3 (Bystrom & Sundqvist, 1981; Sjogren *et al.*, 1991; Sjogren *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 2002). Os valores encontrados neste estudo estão de acordo com os valores apresentados pela literatura, o número de UFC/mL das amostras iniciais variou entre $4,0 \times 10^2$ e $3,0 \times 10^6$ e após o preparo químico-mecânico variou entre 0 e $3,3 \times 10^3$ e após a segunda instrumentação entre 0 e $7,4 \times 10^2$.

O número de UFC após o uso de medicação intracanal variou entre 0 e $8,0 \times 10^3$, com pequenas diferenças dependendo do medicamento intracanal utilizado. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre o número de UFC antes e após o uso de medicamentos intracanaís, ou seja entre as coletas C4 e C5. Resultados similares foram encontrados por Peters *et al.* (2002) após o uso de hidróxido de cálcio por quatro semanas.

Peters *et al.* (2002) encontraram de 2 a 6 microrganismos por canal no início do tratamento e após 4 semanas de medicação com hidróxido de cálcio. No presente estudo o número de espécies no início do atendimento (C1) variou entre 1 e 5 microrganismos por canal após PQM, esse número variou de 1 a 4 (C2 e C4) espécies por canal radicular. Após o uso de medicamento intracanal por 7 dias o número de espécies variou entre 1 e 3 microrganismos por canal. Este fato pode ser explicado pela seleção de casos utilizadas na amostragem. Peters *et al.* (2002) não oferecem detalhes sobre os casos selecionados, entretando, no presente

estudo foram utilizados dentes com necrose pulpar sem sintomatologia, sem comunicação entre cavidade pulpar e cavidade oral. Além disso, muitos deles estavam livres de cáries (já possuíram cárie no passado, mas estavam devidamente restaurados).

Os resultados do presente estudo mostraram que alguns microrganismos não estavam presentes na coleta inicial (ou anteriores) e foram isolados em coletas posteriores. Como por exemplo, os microrganismos *Aerococcus viridans* que foram isolados apenas na coleta 6. Apesar de vários meios seletivos terem sido utilizados neste estudo, a prevalência de alguns microrganismos poderia ser subestimada nas amostras iniciais devido ao crescimento facilitado de alguns endodonto-patógenos em maior número (Vianna *et al.*, 2005). Após a realização da limpeza e modelagem dos canais a maioria dos microrganismos foi eliminada, dando oportunidade para aqueles que estavam em menor número crescerem.

A porcentagem de microrganismos anaeróbios neste estudo foi de aproximadamente 70% no início do atendimento endodôntico, após os preparo químicos-mecânicos esse número tendeu a aumentar (C2, 85% e C4, 72,7%) . Nas coletas após os canais permanecerem com soro fisiológico por 7 dias o número de anaeróbios manteve-se entre 60 e 70%. De forma geral, em todas as coletas, com exceção das coletas após o uso de medicação intracanal que foi de 50%, foram isolados mais microrganismos anaeróbios que aeróbios, o que está de acordo com vários estudos Bergenholtz, 1974; Bystrom & Sundqvist, 1981; Sundqvist *et al.*, 1989; Brauner & Conrads, 1995; Gomes *et al.*, 1996, Sjogren *et al.*, 1997, Le Goff *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2003).

Vários períodos de aplicação de medicação intracanal com hidróxido de cálcio tem sido recomendados. Cvek (1973) obteve 90% de culturas negativas após a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 3 semanas. Bystrom & Sundqvist (1985) obtiveram 100% de culturas negativas após 4 semanas, Reit & Dahlen (1988) 74% após 2 semanas, Sjögren *et al.* (1991) 100% de canais livres de bactérias com o emprego de medicação por uma semana. Ørstavik *et al.* (1991) encontraram 65% das amostras negativas para cultura após

7 dias do emprego de hidróxido de cálcio como medicação intracanal. No presente estudo nem o hidróxido de cálcio, nem a clorexidina ou a associação dos dois medicamentos promoveu a completa desinfecção dos canais radiculares. Esse fato pode ser devido ao emprego de técnicas e meios de culturas diferenciados que podem ter favorecido o cultivo de microrganismos viáveis presentes mesmo em pequenas quantidades.

O número de casos negativos após o uso das medicações intracanaís por 7 dias variou entre 37,5%, para o hidróxido de cálcio, 50% para a clorexidina e 50% também para a associação das substâncias medicamentosas. Esperava-se um número de UFC após o uso de medicação intracanal ser menor ou similar ao obtido após o preparo químico-mecânico, especialmente após à primeira instrumentação, entretanto não foi o que ocorreu na maioria dos casos. Em valores médios, de forma geral para todas medicações, houve um aumento no número de UFC, o que vem de encontro com os achados de Peters *et al.* (2002), que também encontraram um aumento do número de UFC após o uso de 4 semanas de hidróxido de cálcio como medicamento intracanal.

6.1.2.1. MICRORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS E ENDOTOXINAS

A presença de microrganismos Gram-negativos em dentes com polpa necrosada e lesões periapicais tem sido associado aos casos com sintomatologia (Gomes *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2003). Os resultados do presente estudo, em que dentes assintomáticos foram avaliados, mostraram que espécies Gram-negativas, como por exemplo, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Capnocytophaga* foram isoladas em mais de 30% do total de microrganismos cultiváveis. Após o preparo químico-mecânico e utilização de medicação intracanal houve uma tendência à diminuição dos microrganismos Gram-negativos em favor dos Gram-positivos.

As bactérias Gram-negativas também tem sido associadas à reabsorções ósseas periapicais (Sundqvist 1994), como resultado das defesas do hospedeiro.

Para o hospedeiro a estrutura do LPS serve como padrão ou sinal molecular que indica a presença de bactérias Gram-negativas, permitindo a identificação pelo hospedeiro como “non-self” (Medzhitov & Janeway, 2000, 2002). Entretanto, o LPS das bactérias Gram-negativas da cavidade bucal e seus componentes da parte Lípide A parecem não estimular a reação inflamatória na mesma intensidade ou maneira que a clássica reação inflamatória provocada pela endotoxina da *E. coli* (Medzhitov & Janeway, 2000).

Estudos mostraram que bactérias Gram-negativas anaeróbias da cavidade oral, como por exemplo *P. gingivalis*, provocam reações inflamatórias menos intensas que as causadas pelas enterobactérias (Takada & Galanos, 1987; Isogai *et al.*, 1988; Darveau *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1999; Mansheim *et al.*, 1978; Ogawa *et al.*, 1994). Nesses estudos foi verificado que esses microrganismos não induzem a reação de Shwartzman em ratos (Mansheim *et al.*, 1978; Fujiwara *et al.*, 1990). A reação de Shwartzman é uma resposta inflamatória intensa tipicamente associada à endotoxina da *E. coli* (Takada & Kotani, 1992). Essas observações revelam que as endotoxinas envolvidas nas infecções orais possuem uma atividade biológica muito baixa ou nenhuma atividade (Takada & Kotani, 1989). Ainda mais importante elas causam um padrão diferente no estímulo a mediadores da resposta imune (Ogawa & Uchida, 1996; Tanamoto *et al.*, 1997), quando comparado diretamente com a endotoxina da *E. coli*. Há evidências que o LPS das bactérias Gram-negativas orais contém mecanismos independentes do TLR4 para ativação celular (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999) resultando em uma resposta imune *in vivo* distinta (Pulendran *et al.*, 2001).

Estudos tem avaliado a neutralização dos efeitos da endotoxinas provocados por diversas substâncias auxiliares na terapia endodôntica, entretanto, para tal tem-se empregado o LPS de *E. coli* em modelos de estudo *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2005) ou *in vivo* com resposta induzida em cães (Silva *et al.*, 2004; Tanomaru *et al.*, 2003). Visto que há diferenças nas respostas inflamatórias promovidas pelo LPS das enterobactérias e das bactérias da cavidade bucal (*P.*

gingivalis), os resultados dos experimentos com cães dificilmente podem ser comparados aos resultados do presente trabalho aonde foi investigada a situação clínica da redução nas quantidades de LPS presente em canais radiculares de dentes humanos.

O teste utilizado para medir as quantidade de endotoxinas presentes nos canais radiculares antes e após os procedimentos endodônticos foi o teste cromogênico limulus amebocyte lysate (LAL) test (QCL-1000). Este método utiliza um lisado de limulus amebocyte modificado e uma coloração sintética produzida pelo substrato, o que possibilita a quantificação de endotoxinas. Um estudo recente avaliou a concentração de endotoxinas presentes em canais radiculares de dentes com necrose pulpar com e sem sintomatologia (Jacinto *et al.*, 2005). Entretanto, a concentração de endotoxinas em dentes assintomáticos foi muito superior às encontradas no presente estudo. Uma possível explicação para o fato é que Jacinto *et al.* (2005) utilizaram 5 cones de papel para coletar as amostras dos canais radiculares, enquanto que no presente estudo foi utilizado um cone para a coleta. Fato este que, não altera a interpretação dos resultados na presente pesquisa, pois todas as coletas foram realizadas com um cone de papel (C1, C2, C4 e C5) e nosso objetivo foi comparar a quantidade de endotoxinas presentes inicialmente com a redução das mesmas obtidas após PQM e uso de medicação.

Outros estudos (Khabbaz *et al.* 2000, 2001) utilizando o mesmo método para quantificar endotoxinas presentes em dentina cariada em dentes com polpa inflamada encontraram valores médios de 0.157773 ng/mL. No presente estudo a concentração de endotoxinas no interior dos canais radiculares de dentes assintomáticos com necrose pulpar e leões periapicais apresentaram valores médios de 151.61 UE/mL ($1000 \text{ UE/mL} \cong 100 \text{ ng/mL}$), correspondendo a aproximadamente 100 vezes mais que a endotoxina presente nas lesões de cárie.

Visto que o LPS é liberado durante a lise da parede celular, seria esperado que houvesse um aumento na concentração de endotoxinas após os procedimentos endodônticos, o que não ocorreu. O preparo químico-mecânico foi responsável pela maior redução da quantidade de endotoxinas, aproximadamente

65% de redução (porcentagem de valores medianos). Essa redução ocorreu provavelmente devido à remoção mecânica dos debris durante o processo de limpeza e modelagem dos canais, dificilmente por alguma propriedade da clorexidina em neutralizar os efeitos das endotoxinas, visto que essa mesma substância foi utilizada como medicação intracanal por 7 dias e não houve redução significativa.

Após o tratamento com os medicamentos intracanaís, era esperada uma completa ou pelo menos uma grande redução das endotoxinas, especialmente nos grupos que continham hidróxido de cálcio. Nenhum dos três medicamentos testados foi capaz de eliminar as endotoxinas. Níveis mais elevados foram encontrados nos grupos G1 (pasta de hidróxido de cálcio) e G2 (Clorexina gel 2%) que logo após a instrumentação. Parece que no grupo da associação entre hidróxido de cálcio e clorexidina (G3) há um sinergismo entre os medicamentos, encurtando o tempo necessário do hidróxido de cálcio possuir alguma ação sobre o LPS. Vários trabalhos relatam que o tempo necessário para medicações intracanaís à base de hidróxido de cálcio apresentarem atividade antimicrobiana devem ser maiores que 7 dias (Cvek, 1973; Bystrom & Sundqvist, 1985; Reit & Dahlen, 1988), na eliminação do LPS o tempo de 7 dias parece também não ser suficiente para sua completa neutralização. Com relação ao grupo da clorexidina, Tanomaru *et al.* (2003) verificaram que a clorexidina aquosa 2% não foi capaz de inativar a ação do LPS em dentes de cães. Entretanto, nesse estudo, são comparados canais vazios com canais com medicação intracanal (Calen). Todos os grupos em que foram testadas as soluções irrigadoras, incluindo um grupo com clorexidina aquosa 2% os canais foram deixados vazios por 60 dias após instrumentação, favorecendo a recolonização microbiana dos mesmos e perpetuação das lesões periapicais, ou seja, um não reparo tecidual nesses grupos.

Segundo Bartuff *et al.* (2005) verificaram que a porção de endotoxina presente nas vesículas da membrana correspondem a apenas 17%, enquanto que as proteinases correspondem a 66% e os polissacarídeos 21%. Ressaltam ainda

que a presença de endotoxinas em OMV parece não interferir no processo de formação de capilares, pois concentrações inferiores a 100 µg/mL (equivalente a $1,0 \times 10^5$ UE/mL) não são capazes de suprimir essa função. As concentrações de endotoxinas encontradas no presente estudo e até mesmo as encontradas no estudo de Jacinto *et al.* (2005) parecem não ser nocivas ao processo de reparo. As concentrações de endotoxinas encontradas no interior dos canais radiculares não seriam suficientes inibir a formações capilares, função esta que quando suprimida parcialmente pode levar a uma inflamação crônica visto que os fatores de virulência degradam o tecido, promovem uma resposta inflamatória complexa e previnem o reparo devido à falta de vascularização.

6.1.2.2. MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS

As bactérias Gram-positivas também são freqüentemente isoladas de canais radiculares, entretanto apenas poucas espécies desse grupo de microrganismos tem sido reconhecida por estar diretamente relacionada à periodontite apical (Sjogren *et al.*, 1988; Pinheiro *et al.*, 2003). A parede celular das bactérias Gram-positivas, que inclui entre seus componentes peptídeoglicano e ácido lipoteicoico que também são capazes de influenciar reações inflamatórias. Os peptídeoglicanos ativam o sistema complemento e atuam como um estimulador de linfócitos B. O ácido lipoteicoico induz reabsorção óssea e também ativa o sistema complemento (Hausmann *et al.*, 1975; Dewhirst, 1982; Heumann *et al.*, 1994).

Os resultados do presente estudo mostraram que os microrganismos Gram-positivos foram freqüentemente encontrados em todas as coletas, concordando com os achados de Gomes *et al.* (1996). Os bacilos Gram-positivos constituem um importante segmento da flora remanescente, mantendo-se presente mesmo depois da obturação dos canais radiculares (Molander *et al.*, 1998). Esses microrganismos foram freqüentemente encontrados entre 48 e 60% em todas as coletas. Foi verificada que houve freqüência elevada de Gram-

positivos logo após a remoção da medicação intracanal (C5), especialmente os bacilos Gram-positivos (18 em 30 microrganismos isolados no total). Os gêneros mais freqüentemente isolados foram *Actinomyces* sp., *Clostridium* sp. e *Propionibacterium* sp.

Os mecanismos pelos quais os microrganismos Gram-positivos mantêm viáveis nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos são determinados por interações entre espécies (Dahlen & Möller 1992). Por isso, deve haver um particular interesse em explorar os mecanismos pelos quais essas espécies ingressam e permanecem no interior dos canais radiculares após o tratamento endodôntico e sua implicância nas lesões periapicais. As espécies *Actinomyces meyerii*, *Actinomyces israelii* e *Propionibacterium propionicum* parecem possuir habilidades de se estabelecer e sobreviver vivas em tecidos periapicais, ou seja, fora dos canais radiculares (Happonen, 1986; Sjogren *et al.*, 1988; Clarridge & Zhang, 2002). Os *Actinomyces* sp. são considerados colonizadores primários da cavidade bucal e são cruciais no desenvolvimento da placa bacteriana (Yeung, 1999), além disso, têm se mostrado envolvido nas infecções endodônticas persistentes (Kalfas *et al.*, 2001). A sobrevivência em ambientes desprovidos de nutrientes pode ser devido à presença de enzimas extracelulares, por exemplo, aquelas envolvidas no metabolismo de uréia e sucrose (Yeung, 1999). A espécie *Propionibacterium propionicum*, antigamente chamada de *Arachnia propionica*, também é um habitante normal da cavidade bucal e tem sido isolado em mono infecções ou infecções mistas, sua patogenicidade ainda não é esclarecida (Sjogren *et al.*, 1988). No presente estudo esses microrganismos foram isolados nas coletas após o uso de medicamentos intracanaís, o que evidencia a dificuldade em combater infecções com a presença desses microrganismos tanto por meio do preparo químico-mecânico como pelo uso de medicamentos intracanaís.

Outras espécies de bacilos Gram-positivos, em menor freqüência, também se mostraram presentes, principalmente nas amostras iniciais como *Eubacterium*

sp., ou mesmo *Bifidobacterium* sp., os quais persistiram mesmo após o uso de medicação intracanal. *Eubacterium* sp. é um microrganismo assacarolítico, isolado em lesões cariosas, bolsas periodontais e abscessos dento-alveolar (Goodacre *et al.*, 1996). *Bifidobacterium* sp. é um comensal humano intestinal e tem seu uso aplicado como probiótico. A maioria das espécies colonizadoras da cavidade bucal é considerada transitória (Orhage & Nord, 2000). Interessante é que esses microrganismos permaneceram no interior dos canais radiculares mesmo após os procedimentos endodônticos, mostrando-se ser resistentes ao tratamento e até o momento não há conhecimento sobre seu potencial patogênico nas periodontites apicais.

Os Gram-positivos, bacilos e cocos, mostraram ser resistentes à terapia endodôntica, podendo permanecer no interior dos canais radiculares e periápices, podendo ser responsáveis pelas infecções persistentes.

6.1.3. EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS

Foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana (método do E-test, AB BIODISK, Solna, Suécia) as bactérias anaeróbias estritas do gênero *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* isoladas dos canais radiculares estudados. Foram incluídas também as espécies *Propionibacterium propionicum* e *Propionibacterium acnes*.

Como regra geral, um período de 24 horas de incubação não é suficiente para obter um resultado do E-test possível de ser interpretado, quando se testa microrganismos anaeróbios estritos. Estudo de Rosenblatt & Gustafson (1995) relatou que 64% das cepas anaeróbias testadas pelo E-test puderam ser interpretadas após 24 horas de incubação. No entanto, 95% dos mesmos testes puderam ser interpretados após 48 horas de incubação, semelhante ao que ocorreu no presente estudo.

As concentrações inibitórias mínimas determinadas pela NCCLS têm sido usadas em vários estudos bacteriológicos (Nachnani *et al.*, 1992; van-Steenbergen *et al.*, 1993; Rosenblatt & Gustafson, 1995; Poulet *et al.*, 1999; Kuriyama *et al.*, 2000; Kuriyama *et al.*, 2001). Entretanto as CIM determinadas pela NCCLS podem ser muito rigorosas para alguns antibióticos, uma vez que estão abaixo da concentração do antibiótico nos tecidos. Além disso, microorganismos resistentes a determinado antibiótico de acordo com o critério da NCCLS, clinicamente podem ser suscetíveis ao mesmo antibiótico, pois pode haver influência de fatores, como a localização da infecção e dose administrada (Kuriyama *et al.*, 2000).

Apesar da penicilina G (benzilpenicilina) ser um dos agentes antimicrobianos testados no presente estudo, ela é de pouco uso na prática clínica, devido sua administração ser via intramuscular. Para maior segurança do paciente é recomendável a administração da benzilpenicilina em ambientes hospitalares devido à chance de anafilaxia fatal (Newman & Kornman, 1997). Em casos extremos pode ser uma droga de escolha justamente por atingir seu pico de ação entre 30 e 45 minutos. No presente estudo 40% das *Prevotella intermedia* mostraram resistência à benzilpenicilina, 25% das *Prevotella oralis*, 10% dos *Propionibacterium propionicum*. Jacinto *et al.* (2003) encontrou 62,5% dos isolados clínicos de *P. intermedia/nigrescens* sensíveis à penicilina G e Entretanto, a maioria das *Prevotella intermedia/nigrescens* testadas por Dahlén *et al.* (1990) foi sensível à penicilina G. Já Appelbaum *et al.* (1990) encontraram 52% das cepas de *P. intermedia/nigrescens* resistentes à penicilina. Os autores justificaram essa resistência devido à produção de β -lactamase. Kuriyama *et al.* (2000) encontraram mais de 70% dos BPPN suscetíveis à penicilina G, porém utilizaram metodologia diferente do E-test.

Já a amoxicilina, uma penicilina de espectro ampliado (penicilina V), a qual pode ser administrada via oral, é a droga de primeira escolha na prática clínica. Os resultados do presente estudo mostram que todos microrganismos testados

foram suscetíveis à amoxicilina. Sousa *et al.* (2003) avaliaram isolados clínicos da mesma localidade (FOP-UNICAMP) e verificaram que todos microrganismos foram sensíveis à amoxicilina. Lana *et al.* (2001) verificaram que 96,3% anaeróbios estritos isolados de canais radiculares estritos foram suscetíveis à amoxicilina. Já van Winkelhoff *et al.* (2005) observaram “breakpoints” mais elevados para vários microrganismos provenientes da Espanha.

Como era de se esperar a associação amoxicilina e ácido clavulânico também foi eficaz contra todas as cepas testadas. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Cullmann *et al.* (1993), Duerden (1995), Sousa *et al.* (2003), Jacinto *et al.* (2003, 2006).

O cefaclor também pertence à família das beta-lactamases, como os agentes quimioterápicos descritos anteriormente, vinte por cento dos isolados clínicos de *Propionibacterium acnes* e 10% dos de *Propionibacterium propionicum* mostraram ser resistentes a esse quimioterápico. Jacinto *et al.* (2003) testaram a susceptibilidade do cefaclor e verificaram que todos microrganismos avaliados foram sensíveis, entretanto eles não testaram contra *Propionibacterium acnes* e nem *Propionibacterium propionicum*. De acordo com Schellack (2004), existe uma possibilidade de 12% de hipersensibilidade cruzada entre as penicilinas e as cefalosporinas. Então, não deve ser prescrita para pacientes que apresentam reação de hipersensibilidade imediata à penicilina, uma vez que eles podem também ser alérgicos a outros antibióticos β -lactâmicos (Kuriyama *et al.*, 2000).

A eritromicina e clindamicina têm sido prescritas para pacientes alérgicos à penicilina. Contudo tem sido observado que eritromicina não é efetiva contra *Fusobacterium* spp. (Kuriyama *et al.*, 2000, 2001). No presente estudo ambos antibióticos foram efetivos contra aproximadamente 50% dos microrganismos testados, resultado este de acordo com Jacinto *et al.* (2003).

A azitromicina, também pertence ao grupo dos macrolídeos, como a eritromicina, entretanto é um novo macrolídeo, o que possibilita uma única dose diária. Apresentou resistência em 20% dos isolados de *P. propionicum* e *P.*

magnus e 10% dos isolados de *P.acnes*. Jacinto *et al.* (2003) verificaram que 8 de 20 dos isolados de *P gingivalis* foram resistentes a esse agente antibacteriano.

A Clindamicina têm sido totalmente efetiva contra anaeróbios Gram-negativos, particularmente BPPN (Nachnani *et al.*, 1992; van-Steenbergen *et al.*, 1993; Kuriyama *et al.*, 2000, Jacinto *et al.*, 2003). No presente estudo este antimicrobiano apresentou efetividade relativa contra os isolados clínicos testados.

Todos anaeróbios estritos testados foram suscetíveis à amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico, o que também foi encontrado por Jacinto *et al.* (2003) e outros estudos que usaram diferente metodologia (diluição em ágar) (Kuriyama *et al.*, 2000, 2001).

A clindamicina e o metronidazol podem ser recomendados para pacientes nos quais a terapia antimicrobiana com penicilina ou amoxicilina, que são os antibióticos de primeira escolha, tenham falhado (Lewis *et al.*, 1993). Porém vale lembrar que o Metronidazol não foi efetivo contra as espécies do gênero *Propionibacterium*. A Amoxicilina + ácido clavulânico pode ser uma boa escolha (Schellack, 2004) como antibiótico substitutivo, entretanto seu alto custo pode ser um fator limitante na escolha deste medicamento (Lewis *et al.*, 1993).

Diferenças entre resultados de vários estudos pode ocorrer, não somente devido a diferentes metodologias utilizadas, mas também devido a fatores como épocas em que são realizadas as pesquisas, ou áreas geográficas onde são feitos os testes, como reportado por van Winkelhoff *et al.* (2005). Devido a este fato, torna-se importante à realização de estudos periódicos, pois os protocolos estabelecidos para uso de antibacterianos podem não ser universais.

7. CONCLUSÃO

1. A microbiota dos canais radiculares de dentes com polpa necrosada e assintomática é heterogênea, formada principalmente por anaeróbios estritos (principalmente os bacilos Gram-positivos) .
2. Os microrganismos mais freqüentemente isolados em todas as etapas do tratamento endodôntico foram os anaeróbios Gram-positivos, em especial os bacilos: *Actinomyces* sp., *Propionibacterium* sp., *Clostridium* sp. e *Bifidobacterium* sp., os quais foram encontrados mesmo após o preparo químico-mecânico e uso de medicação intracanal.
3. Houve uma alteração da microbiota durante as etapas dos procedimentos endodônticos.
4. O preparo químico-mecânico foi responsável pela maior redução microbiana, entretanto, nem a instrumentação, nem o uso de medicamentos intracanaís promoveram a esterilização dos canais radiculares. O procedimento endodôntico poderia ser concluído na primeira sessão de atendimento.
5. Não se deve deixar canais sem medicação intracanal entre sessões de atendimento.
6. As endotoxinas estavam presentes em todas as amostras analisadas. O preparo químico-mecânico foi a etapa responsável pela maior redução na quantidade de endotoxinas dos canais radiculares, mas não foi capaz de eliminá-las, assim como nenhuma das medicações intracanaís utilizadas pelo período de 7 dias.

7. A amoxicilina ou amoxilina + ácido clavulânico devem ser as medicações de primeira escolha quando necessário o emprego de um agente antimicrobiano via sistêmica, para pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos a azitromicina seria uma alternativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., Dewhirst F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721-32.
2. Abbott P.V., Hume W.R., Pearman J.W. Antibiotics and endodontics. *Aust Dent J.* 1990; 35: 50-60.
3. American Heart Association by the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease: Prevention of Bacterial Endocarditis: Recommendations. *JAMA* 1997; 277: 1794–801, *Circulation* 1997; 96: 358–66, and *JADA* 1997; 128: 1142-50.
4. Andrade E.D. Terapêutica medicamentosa em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas, 2^a ed. 2006; 216.
5. Appelbaum P.C., Spangler S.K., Jacobs M.R. β -lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole, of 320 non-*Bacteroides fragilis* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers. *Ant Agent Chemo* 1990; 34: 1546-1550
6. Barbosa C.A., Goncalves R.B., Siqueira J.F. Jr, De Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod.* 1997; 23: 297-300.
7. Barnett F., Trope M., Kreshtool D., Tronstad L. Suitability of controlled release delivery system for root canal disinfection. *Endod Dent Traumatol.* 1986; 2: 71-74.
8. Barthel C.R., Levin L.G., Reisner H.M., Trope M. TNF-alpha in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod. J* 1997; 30: 155-9.
9. Bartruff J.B., Yukna R.A., Layman D.L. Outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis* affect the growth and function of cultured human

- gingival fibroblasts and umbilical vein endothelial cells. J Periodontol. 2005; 76:972-9.
10. Baron, Samuel. Medical Microbiology, 4th ed., The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 0-9631172-1-1.
 11. Baumgartner J.C., Watkins B.J., Bae K.S., Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. J Endod. 1999; 25: 413-5.
 12. Baumgartner J.C., Falkler Jr W.A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endod. 1991; 17: 380-3.
 13. Becking A.G. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71: 192-96.
 14. Belay, N., Mukhopadhyay B., Conway D.M., Galask R., and Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. J Clin Microbiol. 1990; 28:1666–8.
 15. Beltz R.E., Torabinejad M., Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. J Endod. 2003; 29:334-7.
 16. Berber V.B., Gomes B.P., Sena N.T., Vianna M.E., Ferraz C.C., Zaia A.A., Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006; 39:10-17.
 17. Berber, V.B. Verificação da redução do *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas e técnicas de instrumentação. Piracicaba, 2005. 109 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 18. Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontologisk Revy. 1974; 25: 347-358.
 19. Bergenholtz G., Crawford J.J. Endodontic microbiology. In: Walton R.E. & Torabinejad M., eds. Principles and practice of endodontics. 1st edn. Philadelphia, PA, USA: WB Saunders Co. 1989; 267-82.

20. Bogen G., Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1999; 32: 204-10.
21. Bonesvoll P. Oral pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol.* 1977; 12: 49-65.
22. Brauner A.W., Conrads G. Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis. *Int Endod J.* 1995; 28: 244-8.
23. Buck R.A., Cai J., Eleazer P.D., Staat R.H., Hurst H.E. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001; 27: 325-7.
24. Buttler T.K., Crawford J.J. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J Endod.* 1982; 8:59-66.
25. Byström, A., Happonen, R.P., Sjögren, U., Sundqvist, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3: 58-63.
26. Byström A., Claesson R., Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1: 170-5.
27. Bystrom A., Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg.* 1983; 55: 307-12.
28. Byström, A., Sundqvist, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand. J. Dent. Res.* 1981; 89: 321-8.
29. Calt S., Serper A., Ozcelik B., Dalat M.D. pH changes and calcium ion diffusion from calcium hydroxide dressing materials through root dentin. *J Endod.* 1999; 25: 329-31.
30. Carlsson J. Microbiology of plaque associated periodontal disease. In: Lindhe J., ed. *Textbook of Clinical Periodontology.* Copenhagen, Denmark: Munksgaard. 1990; 129–52.
31. Carlsson J., Frölander F., Sundqvist G. Oxygen tolerance of anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. *Acta Odont Scand.* 1977; 35: 139–45.

32. Cervone F., Tronstad L. & Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 1: 33-6.
33. Chong B.S., Pitt Ford T.T. The role of medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992; 25: 97-106.
34. Chu F.S.C., Tsang P., Chow T.W., Samaranayake L.P. Identifications of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod.* 2005; 31: 424-9.
35. Citron D.M., Ostovari M.I., Karlsson A., Goldstein E.J.C. Evaluation of the E-tet for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2197-203.
36. Clarridge J.E., Zhang Q. Genotypic diversity of clinical *Actinomyces* species: phenotype, source, and disease correlation among genospecies.. 2002; 40: 3442-8.
37. Carlsson J., Frolander F., Sundquist G. Oxygen tolerance of anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. *Acta Odontol Scand.* 1977; 35:139-45.
38. Colak M., Evcil S., Bayindir Y.Z., Yigit N. The effectiveness of three instrumentation techniques on the elimination of *Enterococcus faecalis* from a root canal: an *in vitro* study. *J Contemp Dent Pract.* 2005; 6: 94-106.
39. Coldero L.G., McHugh S., MacKenzie D., Saunders W.P. Reduction in intracanal bacteria during root canal preparation with and without apical enlargement. *Int Endod J.* 2002; 35:437-46.
40. Couroux P.R., Massey V.E., Schieven B.C., Lannigan R., Hussain Z. Comparison of the E-test reference ágar dilution method for susceptibility of Gram-negative anaerobic organisms. *Clin Microbiol Infect Dis.*1993; 100: 301-3.
41. Cullmann W., Frei R., Krech T. Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemotherapy.* 1993; 39: 169-74.
42. Compêndio Médico: Complemento de Atualização. Organização Andrei Editora Ltda. 36 ed. 2000; 2317 p.

43. Souza-Filho FJ & Andrade E.D. Protocolos farmacológicos em endodontia. In: Terapêutica medicamentosa em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas, 2ª ed. 2006; 216 p.
44. Cunningham M.D., Bajorath J., Somerville J.E., Darveau R.P. *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide interactions with CD14: implications for myeloid and nonmyeloid cell activation. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1999; 28: 497-504.
45. Cunningham M.D., Seachord C., Ratcliffe K., Bainbridge B., Aruffo A., Darveau R.P. *Helicobacter pylori* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides are poorly transferred to recombinant soluble CD14. Infect Immun. 1996; 64: 3601-3608.
46. Cury J.A., Rocha E.P., Koo H., Francisco S.B., Del Bel Cury A.A. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. Braz Dent J. 2000; 1: 29-34.
47. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. II. Effect on external root resorption in luxated teeth compared with effect of root filling with guttapucha. A follow-up. Odontol Revy. 1973; 24: 343-54.
48. Dahlen, G., Möller A.J.R. Microbiology of endodontic infections. In: Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 1st edn. St Louis, Missouri, USA: Mosby-Year Book, pp. 444-75. 1992.
49. Dahlen G., Wikstrom M., Renvert S., Gmur R., Guggenheim B. Biochemical and serological characterization of *Bacteroides intermedius* strains isolated from the deep periodontal pocket. J Clin Microbiol. 1990; 28: 2269-74.
50. Dajani A.S., Taubert K.A., Wilson W., Bolger A.F., Bayer A., Ferrieri P., Gewitz M.H., Shulman S.T., Nouri S., Newburger J.W., Hutto C., Pallasch T.J., Gage T.W., Levison M.E., Peter G., Zuccaro G. Jr. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. JAMA. 1997; 277:1794-801.

51. Dametto F.R., Ferraz C.C., Gomes B.P.F.A., Zaia A.A., Teixeira F.B., de Souza-Filho F.J. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99:768-72.
52. Dametto, F.R. Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana imediata e mediata da clorexidina gel 2% usada como irrigante endodôntico contra *Enterococcus faecalis*. Piracicaba, 2002. 100 p.Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
53. Darveau R.P., Cunningham M.D., Bailey T., Seachord C., Ratcliffe K., Bainbridge B. Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. Infect Immun. 1995; 63: 1311-17.
54. De Rossi A., Silva L.A., Leonardo M.R., Rocha L.B., Rossi M.A. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99: 628-36.
55. Deardorf K.A., Swartz M.L., Newton C.W., Brown C.E. Jr. Effect of root canal treatments on dentin permeability. J Endod. 1994; 20:1-5.
56. Delany G.M., Patterson S.S., Miller M.S., Newton C.W. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982; 53: 518-23.
57. Dewhirst F.E. N-acetyl muramyl dipeptide stimulation of bone resorption in tissue culture. Infect Immun. 1982; 35: 133-7.
58. Dixon D.R., Darveau R.P. Lipopolysaccharide Heterogeneity: Innate Host Responses to Bacterial Modification of Lipid A Structure. J Dent Res. 2005; 84:584-95.

59. Difiore, P.M., Peters, D.D., Setterstrom, J.A. The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983; 55: 91-4.
60. Duerden B.I. Role of the reference laboratory in susceptibility testing of anaerobes and a survey of isolates referred from laboratories in England and Wales during 1993-1994. Clin Infect Diseases 1995; 20: S180-186.
61. Ercan E., Ozekinci T., Atakul F., Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. J Endod. 2004; 30:84-7.
62. Estrela C., Pimenta F.C., Ito I.Y., Bammann L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. J Endod. 1999; 25: 416-8.
63. Estrela C., Pimenta F.C., Ito I.Y., Bammann L. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. J. Endodon. 1998; 15-17.
64. Estrela C., Sydney G. B., Bammann L.L., Felipe I.R. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. Braz. Dent. J. 1995; 6: 85-90.
65. Fabricius L., Dahle'n G., Ohman A.E., Möller A JR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982; 90: 134–144. (a)
66. Fabricius L., Dahle'n G., Holm S.E., Möller A JR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand J Dent Res. 1982; 90: 200–206. (b)
67. Fardal O., Turnbull R.S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. J Am Dent Assoc. 1986; 112: 863-869.
68. Fava L.R.G., Saunders W.P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. Int Endod J. 1999; 32: 257-282.
69. Ferrari P.H., Cai S., Bombana A.C. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. Int Endod J. 2005; 38: 372-80.

70. Ferraz C.C.R., Gomes B.P.F.A., Zaia A.A., Teixeira F.B., Souza-Filho F.J. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod 2001; 7: 452-5.
71. Ferraz C.C.R. Avaliação *in vitro* do gel de Clorexidina usado como irrigante endodôntico. Piracicaba ,1999. 141p.Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
72. Foley D.B., Weine F.S., Hagen J.C., deObarrio J.J. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacterioides melaninogenicus* from the root canal system: an in vitro study. J Endod 1983; 9: 236-41.
73. Forbes G.M., Collins B.J., McCullough C.A., Coombs G.W., Robins P.D. Short duration therapy for *Helicobacter pylori* in Western Australia: the impact of metronidazole resistance. Aust N Z J Med. 1998; 28: 13-7.
74. Foschi F., Cavrini F., Montebugnoli L., Stashenko P., Sambri V., Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 289-95.
75. Fujiwara T., Ogawa T., Sobue S., Hamada S. Chemical, immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. J Gen Microbiol. 1990; 136: 319-26.
76. Gatti J.J., Dobeck J.M., Smith C., White R.R., Socransky S.S., Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. Endod Dent Traumatol. 2000; 16: 197-204.
77. Gernhardt C.R., Eppendorf K., Kozlowski A., Brandt M. Toxicity concentrated sodium hypochlorite used as endodontic irrigant. Int Endod J 2004; 37: 272-80.
78. Gibbons R.J., Engle L.P. Vitamin K compounds in bacteria that are obligate anaerobes. Science 1964; 146: 1307-9.
79. Gomes B.P.F.A., Vianna M.E., Sena N.T., Zaia A.A., Ferraz C.C.R., Souza-Filho F.J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102: 544-50.

80. Gomes B.P., Jacinto R.C., Pinheiro E.T., Sousa E.L., Zaia A.A., Ferraz C.C., Souza-Filho F.J. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 211-5.
81. Gomes B.P., Pinheiro E.T., Gade-Neto C.R., Sousa E.L., Ferraz C.C., Zaia A.A., Teixeira F.B., Souza-Filho F.J. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19:71-6.
82. Gomes B.P.F.A., Carvalho S.S., Ferraz C.C.R., Teixeira F.B., Souza-Filho F.J. *In vitro* antibacterial activity of chlorhexidine gel and calcium hydroxide separately and combined on infected bovine root dentin . Int Endod J. 2003; 36: 267-75. (a)
83. Gomes B.P., Sato E., Ferraz C.C., Teixeira F.B., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. Int Endod J. 2003; 36: 604-9. (b)
84. Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Vianna M.E., Rosalen P.L., Teixeira F.B., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. Brazilian Dent. J. 2002; 13: 155-61.
85. Gomes B.P.F.A. Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico. Piracicaba, 2002. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual de Campinas.
86. Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Vianna M.E., Berber, V.B., Teixeira F.B., Souza Filho F. J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2001; 34: 424-8.
87. Gomes B.P.F.A., Drucker D.B., Lilley J.D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J. 1996; 27: 291-8. (a)

88. Gomes B.P.F.A., Lilley J.D., Drucker D.B. Variations in the susceptibilities of the root canal microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996; 29: 235-41. (b)
89. Gomes B.P.F.A. An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK 1995.
90. Gomes B.P.F.A., Drucker D.B., Lilley J.D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27: 291-8 (a).
91. Goodacre R., Hiom S.J., Cheeseman S.L., Murdoch D., Weightman A.J., Wade W.G. Identification and discrimination of oral asaccharolytic *Eubacterium* spp. by pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. *Current Microbiol.* 1996; 32: 77-84.
92. Grad H.A. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan.* 1997; 90: 64-72.
93. Greenstein G., Berman C., Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986; 57: 370-7.
94. Grenier D., Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infect Immun.* 1986; 53: 616-20.
95. Groppo F.C., del Fiol F., Andrade E.D. Profilaxia tratamento das infecções bacterianas. In: *Terapêutica medicamentosa em Odontologia.* São Paulo: Artes Médicas, 2^a ed. 2006: 216.
96. Haapasalo H.K., Siren E.K., Waltimo T.M.T., Ørstavik D., Haapasalo M.P.P. Inactivation of local root canal medicaments by dentin: an *in vitro* study. *Int Endod J.* 2000; 33: 126-131.
97. Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root infections. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5: 1-10.
98. Haapasalo M., Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987; 66: 1375-1379.
99. Happonen R.P. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. *Endod Dent Traumatol.* 1986; 2: 205-9.

100. Hauman C.H.J., Love R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003; 36: 75-85.
101. Hausmann E., Luderitz O., Knox K., Weinfeld N. Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. *J Dent Res.* 1975; 54: 94-99.
102. Heithersay, G.S. Calcium Hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Brit Endod Soc.* 1975; 8: 74-92.
103. Heling I., Sommer M., Steinberg D., Friedman M., Sela M.N. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentine sterilization. *Int Endod J.* 1992; 25: 15-19. (a)
104. Heling I., Steinberg D., Kenig S., Gavrilovich I., Sela M.N., Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J.* 1992; 25: 20-24. (b)
105. Hennessey, T.D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res.* 1973; 12: 61-67
106. Heumann D., Barras C., Severin A., Glauser M.P., Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun.* 1994; 62: 2715-2721.
107. Hong C.Y., Lin S.K., Kok S.H., Cheng S.J., Lee M.S., Wang T.M., Chen C.S., Lin L.D., Wang J.S. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33:162-169.
108. Hülsmann M., Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000; 33:186-93.
109. Isogai H., Isogai E., Fujii N., Oguma K., Kagota W., Takano K. Histological changes and some *in vitro* biological activities induced by lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene.* 1988; 269: 64-77.

110. Jacinto R.C., Gomes B.P., Shah H.N., Ferraz C.C., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J.* 2006; 39: 62-70.
111. Jacinto R.C., Gomes B.P., Shah H.N., Ferraz C.C., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 777-83.
112. Jacinto R.C., Gomes B.P., Ferraz C.C., Zaia A.A., Filho F.J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18:285-92.
113. Jansen H.J., van der Hoeven J.S. Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *Actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein-cleaving oral bacteria in serum. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 346–53.
114. Jansen H.J. The periodontal microflora as a proteindependent anaerobic degradation system. Department of Preventative Dentistry and Periodontology, University of Nijmegen, the Netherlands, 1996.
115. Jeansonne M.J. & White R.R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.*1994; 20: 276-8.
116. Jung I.I.Y, Choi B.K., Lee S.J., Lee C.Y., Park D.S. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000; 26: 599-604.
117. Kakehashi S., Stanley H.R., Fitzgerald R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* 1965; 20: 340-9.
118. Kalfas S., Figdor D., Sundqvist G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces radicidentis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 208-14.

119. Kantz W.E., Henry C.A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of nonvital teeth in man. *Archs Oral Biol* 1974; 19: 91–6.
120. Karlin, D.A., Jones R.D., Stroehlein J.R., Mastromarino A.J., Potter G.D. Breath methane excretion in patients with unresected colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1982; 69: 573–6.
121. Kaufman A.Y., Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J. Endodon.* 1989; 15: 224-226.
122. Kehoe J.C. pH reversal following in vitro bleaching of pulpless teeth. *J Endod.* 1987; 13: 6-9.
123. Khabbaz M.G., Anastasiadis P.L., Sykaras S.N. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91: 587-93.
124. Khabbaz M.G., Anastasiadis P.L., Sykaras S.N. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J.* 2000; 33: 132-7.
125. Kobayashi T., Hayashi A., Yoshikawa R., Okuda K., Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J.* 1990; 23: 100–6.
126. Komorowski R., Grad H., Wu X.Y., Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod.* 2000; 26:315-7.
127. Kontakiotis E., Nakou M., Georgopoulou M. *In vitro* study of indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J.* 1995; 28: 285-98.
128. Kuriyama T., Karasawa T., Nakagawa K., Saiki Y., Yamamoto E., Nakamura S. Bacteriology and antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol. Immunol.* 2002; 17: 132-5.
129. Kuriyama T., Karasawa T., Nakagawa K., Saiki Y., Yamamoto E., Nakamura S. Incidence of β -lactamase production and antimicrobial susceptibility of anaerobic Gram-negative rods isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16: 10-15.

130. Kuriyama T., Karasawa T., Nakagawa K., Saiki Y., Yamamoto E., Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*2000; 90: 600-8.
131. Lana M.A., Ribeiro-Sobrinho A.P., Stehling R., Garcia G.D., Silva B.K., Hamdan J.S., Nicoli J.R., Carvalho M.A., de M. Farias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16: 100–5.
132. Le Goff A., Bunetel L., Mouton C., Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol. Immunol.* 1997; 12: 318-22.
133. Lenet B.J., Komorowski R., Wu X.Y., Huang J., Grad H., Lawrence H.P., Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod.* 2000; 26: 652-5.
134. Leonardo M.L., Silva R.A.B., Assed S., Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics *J Appl Oral Sci.* 2004; 12: 93-8.
135. Leonardo M.R., da Silva LA, Tanomaru Filho M., Bonifacio K.C., Ito I.Y. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod.* 2000; 26:391-4.
136. Leonardo M.R., Tanomaru Filho M., Silva L.A.B., Nelson Filho P., Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod.* 1999; 25: 167-71.
137. Lepp, P.W., Brinig M.M., Ouverney C.C., Palm K., Armitage G.C., Relman D.A. Methanogenic archaea and human periodontal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004;101:6176–81.
138. Lev M., Keudell K.C., Milford A.F. Succinate as a growth factor for *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol.* 1971; 108: 175–8.
139. Lewis M.A.O., Carmichael F., MacFarlane, Milligan S.G. A randomised trial of co-amoxiclav (Augmentin) versus penicillin V in the treatment of acute dentoalveolar abscess. *Braz Dent J.* 1993; 175: 169-74.

140. Wang X, Zhang C, Lin Q. Alteration of immunological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2001; 36: 417-20.
141. Lindskog S., Pierce A.M., Blomlof L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol*. 1998; 14:186-90.
142. Loesche W.J. Importance of nutrition in gingival crevice microbial ecology. *Periodontics*. 1968; 6: 245–9.
143. Loesche W.J., Gusberti F., Mettraux G., Higgins T., Syed S. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun*. 1983; 42: 659–67.
144. Love R.M. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17: 32–7.
145. Mackane L., Kadel J. Essential and applications. New York: McGraw-Hill. 1986; 352-4.
146. Mansheim B.J., Onderdonk A.B., Kasper D.L. Immunochemical and biologic studies of the lipopolysaccharide of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *asaccharolyticus*. *J Immun*. 1978; 120: 72-8.
147. Marsh P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149: 279–94
148. Marsh P.D. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res*. 1989; 68: 1567–75.
149. Massey V.E., Lannigan R., Hussain Z. Evaluation of susceptibility of anaerobic organisms by the E-test and the reference ágar dilution method. *Clin Infect Diseases*. 1995; 20: 337-8.
150. McGurkin-Smith R., Trope M., Caplan D., Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod*. 2005; 31:359-63.
151. Medzhitov R., Janeway C.A. Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002; 296: 298-300.

152. Medzhitov R., Janeway C.A. Jr. How does the immune system distinguish self from nonself?. *Seminars Immun.* 2000; 12: 185-8.
153. Miller W.D. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dental Cosmos* 1894; 36: 505-28.
154. Mims C., Dimmock N., Nash A., Stephen J. Mims' Pathogenesis of Infectious Disease. New York: Academic Press, 1995.
155. Molander A., Reit C., Dahlen G., Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 1-7.
156. Möller A.J.R, Fabricius L., Dahlen G., Öhman A.E., Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scan J Dent Res.* 1981; 89: 475-84.
157. Moore W.E.C., Moore L.V.H. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 1994; 5: 66–77.
158. Moraes S.R., Siqueira Jr J.F., Colombo A.P., Rôças I.N., Ferreira M.C.S., Domingues R.M.C.P. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod.* 2002; 28: 86-9.
159. Morse D.R. Microbiology and Pharmacology. In: Chens S & Burns RC, eds. *Pathways of the pulp.* 4th ed. St. Louis, MO, USA: CV Mosby Co. 1987.
160. Nachnani S., Scuteri A., Newman M.G., Avanesian A.B., Lomeli S.L. E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *J Periodontol.* 1992; 63: 576-83.
161. Naenni N., Thoma K., Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004; 30:785-7.
162. Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J. Endod.* 1987; 1: 29-39.
163. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard,

- 5th ed. 2000. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
164. Nelson-Filho P., Leonardo M.L., Silva L.A.B., Assed S. Radiografic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. J Endod .2002; 28: 694-6.
 165. Nerwich A., Figdor D., Endo D., Messer H.H. Ph changes in root dentin over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. J. Endodon. 1993; 96: 302-6.
 166. Newman M., Kornman K. O uso de antibióticos e antimicrobianos na prática odontológica. São Paulo: Quintessence editora Ltda., 1ª ed. 1997: 262 p.
 167. Niwa M., Milner K.C., Ribi E., Rudbach J.A. Alteration of Physical Chemical and Biological Properties of Endotoxin by Treatment with Mild Alkali. J. Bac. 1969; 97: 1069.
 168. Ogawa T., Uchida H. Differential induction of IL-1 beta and IL-6 production by the nontoxic lipid A from *Porphyromonas gingivalis* in comparison with synthetic *Escherichia coli* lipid A in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immun Medical Microbiol. 1996; 14: 1-13.
 169. Ogawa T., Uchida H., Amino K. Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiology . 1994; 140: 1209-16.
 170. Ohno N., Morrison D.C. Interaction of Lysozyme with Bacterial Lipopolysaccharide. The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 1988; 2: 680.
 171. Ohta H., Kato K., Fukui K., Gottschal J.C. Microbial interactions and the development of periodontal disease. J Periodontal Res. 1991; 26: 255–7.
 172. Oliveira L.D., Leao M.V.P., Carvalho C.A.T., Camargo C.H.R., Valera M.C., Jorge A.O.C. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. J Dent 2005; 33: 107-114.

173. Oliveira J.C.M., Siqueira J.F. Jr, Alves G.B., Hirata R. Jr, Andrade A.F. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. J Endod. 2000; 26: 729-32.
174. Orrhage K., Nord C.E. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. Drugs Experiment Clin Res. 2000; 26, 95-111.
175. Ørstavik D., Kerekes K., Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. Int Endod J. 1991; 24: 1-7.
176. Ørstavik D., Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol. 1990; 6: 142-9.
177. Pacios M.G., de la Casa M.L., de los Angeles Bulacio M., Lopez M.E. Calcium hydroxide's association with different vehicles: *In vitro* action on some dentinal components. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 96-101.
178. Person S., Edlund M.B., Claesson R., Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methylmercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol. 1990; 5: 195–201.
179. Peters L.B., Wesselink P.R., van Winkelhoff A.J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. Int Endod J. 2002; 35: 698–702.
180. Pinheiro E.T., Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C., Sousa E.L., Teixeira F.B., Souza-Filho F.J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003; 36: 1-11.
181. Podbielski A., Spahr A., Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. J Endod. 2003; 29: 340-5.
182. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science. 1998; 282: 2085-8.

183. Poulet P.P., Duffaut D. Lodter J.P. Evaluation of the E-test for determining the in-vitro susceptibilities of *Prevotella intermedia* isolates to metronidazole. J Antimicrob Chemother. 1999; 43: 610-11.
184. Pulendran B., Kumar P., Cutler C.W., Mohamadzadeh M., Van Dyke T., Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. J Immun. 2001; 167: 5067-76.
185. Qureshi S.T., Lariviere L., Leveque G., Clermont S., Moore K.J., Gros P. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). J Exp Med Sc. 1999; 189: 615-25.
186. Reit C., Dahlen G. Decision making analysis of endodontic treatment strategies in teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1988; 21: 291-9.
187. Rietschel E.T., Brade H. Bacterial-Endotoxins. Scientific American. 1992; 267: 54-61.
188. Roache Y., Yoshinori R.N. In vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. J Antimicrob Chemother. 1997; 40: 353-7.
189. Roças I.N., Siqueira J.F. Jr. Occurrence of two newly named oral treponemes - *Treponema parvum* and *Treponema putidum* - in primary endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 372-5.
190. Roças I.N., Siqueira J.F. Jr, Andrade A.F., Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. Int Endod J. 2003; 36: 20-6.
191. Rosenblatt J.E., Gustafson D.R. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. Diag Microbiol Inf Dis. 1995; 22: 279-84.
192. Safavi K., Nakayama T.A. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. J Endod. 2000; 26: 649-51.
193. Safavi K.E., Nichols F.C., Effect of Calcium Hydroxide on Bacterial Lipopolysaccharide. J Endod 1993; 19: 76-8.
194. Safavi, K.E., Spangberg, L.S.W., Langerland, K. Root canal dentinal tubule disinfection. J. Endod. 1990; 16:207-10.

195. Sant'anna A.T., Ramalho L.T.O, Spolidorio DMP. Effect of the formocresol on bacterial LPS in mouse's subcutaneous tissue. J Dent Res. 2000; 79: 1084.
196. Schafer E., al Behaissi A. pH changes in root dentin after root canal dressing with gutta-percha points containing calcium hydroxide. J Endod. 2000; 26:665-667.
197. Schellack G. Farmacologia na prática clínica da área da saúde. São Paulo: Fundamento Educacional, 1ª ed. 2004: 190.
198. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. D. Clin. N. Amer. 1974; 18: 269-96.
199. Schein B., Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. J Endod. 1975; 1:19-21.
200. Sen B.H., Piskin B., Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod. Dent. Traumatol. 1995; 11: 6-9.
201. Serene T.P., Anderson D.L. Isolation of *Mycoplasma* from human root canals. J. Dent. Res. 1967; 49: 395-9.
202. Slofstra S.H., Spek C.A., ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. Hemat J. 2003; 4: 295-302.
203. Shih M., Marshall F.J., Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1970; 29:613-9.
204. Shuping G.B., Orstavik D., Sigurdsson A., Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. J Endod. 2000; 26:751-5.
205. Silva L.A., Leonardo M.R., Assed S., Tanomaru F.M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. B Dent J. 2004; 15: 109-14.
206. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3314-9.

207. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N. Nested PCR detection of *Centipeda periodontii* in primary endodontic infections. J Endod. 2004; 30:135-7.
208. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA-directed multiplex PCR. J Endod. 2004; 30: 851-4.
209. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N., Andrade A.F., de Uzeda M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. J Endod. 2003; 29:111-3.
210. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. Int Endod J. 2003; 36: 174-80.
211. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent. 2003; 31: 333-39.
212. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T amylovorum*, *T medium*, and *T lecithinolyticum* in primary root canal infections. Arch Oral Biol. 2003; 48:495-502.
213. Siqueira J.F. Jr, Roças I.N. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod. 2003; 29: 244-7
214. Siqueira J.F., Roças I.N. Positive and negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary endodontic infections. J Endod. 2003; 29: 438-41.
215. Siqueira J.F. Jr, Rocas I.N., Santos S.R., Lima K.C., Magalhaes F.A., de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. J Endod. 2002; 28:181-4.
216. Siqueira Jr. J.F., Roças I.N., Favieri A., Oliveira J.C.M., Santos K.R.N. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. Int Endod J 2001; 34: 280-4.
217. Siqueira Jr. J.F., Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. J Endod. 2001; 27:563-6

218. Siqueira Jr. J.F., Roças I.N., Souto R., Uzeda M., Colombo A.P. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 89: 744-8.
219. Siqueira Jr. J.F., Lima K.C., Magalhaes F.A., Lopes H.P., de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999; 25: 332-5.
220. Siqueira Jr J.F., Lopes, H. P. Microbiologia endodôntica. In: Siqueira Jr. J. F., Lopes H. P. *Endodontia. Biologia e Técnica.* Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 650 p.
221. Siqueira Junior, J. F.; Batista, M. D. M.; Fraga, R.C. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998; 24:414-6.
222. Siqueira Jr. J.F., Uzeda, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J.Endod.* 1997; 3: 167-9.
223. Siqueira Jr J.F., Uzeda, M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22: 674-6.
224. Siren E., Haapasalo M., Ranta K., Salmi P., Kerosuo E. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997; 30: 91-5.
225. Siren E.K., Haapasalo M.P., Waltimo T.M., Orstavik D. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 326-31.
226. Siren E.K., Haapasalo M.P., Ranta K., Salmi P., Kerosuo E.N.J. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997; 30: 91-5.
227. Sjogren U., Figdor D., Persson S., Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 5:297-306.

228. Sjögren U., Figdor D., Spangberg L., Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24: 119-25.
229. Sjögren U., Hägglund B., Sundqvist G., Wing K. Factors Affecting the Long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990; 16: 498-504.
230. Sjögren U., Happonen R.P., Kahnberg K.E., Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* 1988; 21: 277-82.
231. Sjogren U., Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 63:366-70.
232. Sousa E.L., Ferraz C.C., Gomes B.P., Pinheiro E.T., Teixeira F.B., Souza-Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96: 332-9.
233. Souza-Filho F.J., Andrade E.D. Protocolos farmacológicos em endodontia. In: *Terapêutica medicamentosa em Odontologia.* São Paulo: Artes Médicas, 2^a ed. 2006: 216 p.
234. Spangberg L., Engström B., Langeland K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973; 36: 856-70.
235. Spangberg L.S.W: Intracanal medication. In: *Endodontics.* Ingle JI, Bakland L. eds. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994; 627-40.
236. Spangberg L.S.M. Endodontic Medicaments. In: Smith DC & Williams DF, eds. *Biocompatibility of Dental Materials* 1st edn. Boca Raton, USA: CRC Press. 1982; 223-57.
237. Spangler S.K., Jacobs M.R., Appelbaum P.C. Susceptibilities of 201 anaerobes to erythromycin, azithromycin, clarithromycin and roxithromycin by oxyrase ágar dilution and E-test methodologies. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1366-7.
238. Stevens R.H., Grossman L.I. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod.* 1983; 9: 372-4.

239. Sundqvist G., Figdor D. Life as endodontopathogen. *Endodontic Topics*. 2003; 6: 3–28
240. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1994; 78: 522-30.
241. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992; 7: 257–62. (a)
242. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992; 18: 427–430. (b)
243. Sundqvist G., Johansson E., Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod*. 1989; 15: 13-9.
244. Sundqvist G., Carlsson J., Herrmann B., Tánvik A. Degradation of human immunoglobulins G and Mand complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol*. 1985; 19: 85–94.
245. Sundqvist G.K., Eckerbom M.I., Larsson A.P., Sjogren U.T. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun*. 1979; 25:685-93.
246. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. *Odontological Dissertation n° 7*. University of Umea, Sweden 1976.
247. Suzuki K. Antimicrobial effect of calcium hydroxide on bacteria isolated from infected root canals. *Dentistry in Japan*. 1999; 35: 43-7.
248. Takada H. and Kotani S. Structure-function relationship of lipid A. In: *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides*. Morrison DC, Ryan JL, editors CRC Press.inc. 108-134. 1992.
249. Takada H., Galanos C. Enhancement of endotoxin lethality and generation of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides in muramyl-dipeptide-treated mice. *Inf Immun*. 1987; 55: 409-13.
250. Takada H., Kotani S. Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. *Critl Rev Microbiol*. 1989: 16: 477-523.
251. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*. 1998; 31: 311-25.

252. Tanamoto K., Azumi S., Haishima Y., Kumada H., Umemoto T. Endotoxic properties of free lipid A from *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. 1997; 143: 63-71.
253. Tanomaru J.M.G., Leonardo M.R., Tanomaru-Filho M., Bonetti- Filho I., Silva L.A.B. Effect of different irrigation solutions and calcium hidroxiide on bacterial LPS. Int Endod J. 2003; 36:733-9.
254. Tanomaru Filho M., Leonardo M.R., Silva L.A.B., Anibal E.F., Faccioli L.H. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. Int Endod J. 2002; 35: 735-9.
255. Tanriverdi F., Esener T., Erganis O., Belli S. An *in vitro* test model for investigation of disinfection of dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis*. Braz Dent J. 1997; 8: 67-72.
256. ter Steeg P.F., van der Hoeven J.S. Development of periodontal microflora on human serum. Microb Ecol Health Dis. 1989; 2: 1–10.
257. Thilo B.E., Baehni P., Holz J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. J Endod. 1986; 12: 202–205.
258. Tronstad L., Andreasen J.O., Hasselgren G., Kristerson L., Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. J Endod. 1980; 7: 17-21.
259. Tronstad L., Kreshtool D., Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. Endod. Dent. Traumatol. 1990; 6: 129-36.
260. van Winkelhoff A.J., Herrera D., Oteo A., Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. J Clin Periodontol. 2005; 32: 893–8.
261. van Winkelhoff A.J., van Steenberghe T.J.M., Graaf J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: Its Role in Endodontal Infections. J Endod. 1992;18:431-4.

262. van-Steenbergen T.J.M., van-Winkelhoff A.J., Graaff J., Duerden B.I. Antibiotic susceptibilities of black-pigmented Gram-negative anaerobes. *Immun Med Microbiol.* 1993; 6: 229-34.
263. Vianna M.E., Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Zilio C.C.R., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. pH evaluation of several calcium hydroxide pastes at different periods of time. *Braz Dent J*, *in press*
264. Vianna M.E., Gomes B.P.F.A., Conrads G., Horz H.P. Quantification and characterization of *Synergistes* in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.*, *in press*.
265. Vianna M.E., Horz H-P, Gomes B.P.F.A., Conrads G. *In vitro* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006; 39: 484-92.
266. Vianna M.E., Conrads G., Gomes B.P.F.A., Horz H-P. Identification and quantification of *Archaea* in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2006; 1274-82.
267. Vianna M.E., Gomes B.P., Sena N.T., Zaia A.A., Ferraz C.C., Souza Filho F.J. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J.* 2005; 16:175-80
268. Vianna M.E., Horz H-P., Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 253–8.
269. Vianna M.E., Gomes B.P., Berber V.B., Zaia A.A., Ferraz C.C., de Souza-Filho F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 79-84.
270. Vianna M.E. Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanaís. 2002. 293p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica [Piracicaba]) - Universidade Estadual de Campinas.

271. Vigil G.V., Wayman B.E., Dazey S.E., Fowler C.B., Bradley D.V. Jr. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. J Endod 1997; 23:110-14.
272. Villanueva L.E.C.P. Fusobacterium nucleatum in endodontic flare-ups. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.2002; 93:179-83.
273. Vivacqua-Gomes N., Gurgel-Filho E.D., Gomes B.P., Ferraz C.C., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. Int Endod J. 2005; 38: 697-704
274. Walker A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. J Am Assoc 1936; 23: 1418-24.
275. Waltimo T.M., Orstavik D., Siren E.K., Haapasalo M.P. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. Int Endod J. 1999; 32: 421-9.
276. Waltimo T.M., Sirén E., Torkko H., Olsen I., Haapasalo M. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. Int Endod J. 1997; 30: 96-101.
277. Westphal O. Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture. International Archives of Allergy and Applied Immunology.1975; 49: 1-43.
278. White R.R., Hays G.L. & Janer L.R. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod.1997; 23: 229-31.
279. Wittgow W.C. Jr, Sabiston C.B. Jr. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. J Endod. 1975; 1: 168–71.
280. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87: 4576–9.
281. Xia T., Baumgartner J.C., David L.L. Isolation and identification of *Prevotella tannerae* from endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2000; 15: 273-5.

282. Yamamoto K., Fukushima H., Tsuchiya H., Sagawa H. Antimicrobial susceptibilities of *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, and *Bacteroides* isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. J Endod. 1989; 15: 112-6.
283. Yeung M.K. Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the Am Ass Oral Biol. 1999; 10: 120-38.
284. Yoshida M., Fukushima H., Yamamoto K., Ogawa K., Toda T., Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. J Endod. 1987; 13: 24-8.
285. Zerella J.A., Fouad A.F., Spangberg L.S. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 100: 756-61.
286. de Souza C.A., Teles R.P., Souto R., Chaves M.A., Colombo A.P. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. J Endod. 2005; 31:79-83.

ANEXOS

1. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAS DOS PACIENTES

Caso: 1
 Idade: 33
 Dente: 22
 Medicação: CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 4 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
1.1	10000	4	<i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Actinomyces meyeri</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ F Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ A	187,283	1.1.2/1.1.4 1.1.3 1.1.6 1.1.9
1.2	20	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	95,291	1.2.1
1.3	40	1	<i>Streptococcus salivarius</i>	Coco G+ F	-	1.3.1
1.4	Ø	0			108,283	
1.5	Ø	0			95,291	
1.6	Ø	0			-	

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismos
1.1.2	<i>Propionibacterium propionicum</i>
1.1.3	<i>Propionibacterium acnes</i>
1.2.1	<i>Propionibacterium propionicum</i>

Caso: 2
 Idade: 20 anos
 Dente: 11
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesão: 10 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
2.1	442000	5	<i>Eubacterium lentum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i>	Bacilo G+ A Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ A Bacilo G- A Bacilo G+ F	71,917	2.1.2/2.1.4 2.1.3 2.1.5 2.1.6/2.1.7/2.1.8 2.1.9
2.2	Ø	0			62,072	
2.3	960	1	<i>Streptococcus mitis</i>	Coco G+ F	-	2.3.1
2.4	Ø	0			33,541	
2.5	100	3	<i>Neisseria subflava</i> <i>Actinomyces meyeri</i> <i>Aerococcus viridans</i>	Coco G- F Bacilo G+ F Coco G+ F	34,145	2.5.1 2.5.2 2.5.4
2.6	540	5	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Veillonella spp</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo G+ F Bacilo G+ A Coco G- A Bacilo G+ A Bacilo G+ A		2.6.2 2.6.3/2.6.8 2.6.4 2.6.5 2.6.6

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismos
2.1.5	<i>Propionibacterium propionicum</i>
2.1.6/2.1.7/2.1.8	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
2.6.6	<i>Fusobacterium nucleatum</i>

Caso: 3
 Idade: 34 anos
 Dente: 22
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesao: 5 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
3.1	1000000	5	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Eubacterium lentum</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Bacteroides gracilis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ A Bacilo G+ A Bacilo G- A Bacilo G- A	214,569	3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5
3.2	Ø	0			53,031	
3.3	7000	4	<i>Veillonella spp.</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Eubacterium limosum</i>	Coco G- A Coco G+ F Bacilo G- A Bacilo G+ A	-	3.3.1/3.3.5 3.3.2/3.3.3 3.3.4 3.3.6
3.4	Ø	0			26,433	
3.5	Ø				77,876	
3.6	1200	2	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Actinomyces viscosus</i>	Bacilo G+ A Bacilo G- F		3.6.1 3.6.2/3.6.4

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismos
3.1.3	<i>Propionibacterium acnes</i>
3.1.5	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
3.3.4	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
3.6.1	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 4
 Idade: 20 anos
 Dente: 12
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesão: 10 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
4.1	25000	4	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Actinomyces viscosus</i>	Coco G+ CO ₂ Coco G+ F Bacilo G+ F Bacilo G+ F	45,128	4.1.1/ 4.1.3 4.1.2 4.1.5 4.1.8/ 4.1.9/ 4.1.10
4.2	0	0			40,306	
4.3	2000	2	<i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ F	-	4.3.3/4.3.8 4.3.4
4.4	0	0			48,008	
4.5	0				44,325	
4.6	3600	2	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Saphylococcus xylosus</i>	Bacilo G+ A Coco G+ F	-	3.6.1 3.6.2/3.6.4

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismos
3.1.3	<i>Propionibacterium acnes</i>
3.1.4	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
3.6.1	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 5
 Idade: 19 anos
 Dente: 21
 Medicação: CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 10 mm
 Com fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
5.1	760000	5	<i>Eubacterium lentum</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Haemophilus aprofhyllus</i>	Bacilo G+ A Bacilo G- A Bacilo G+ A Coco G+ F Cocobacilo G- F	124,96	5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5
5.2	400	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	54,303	5.2.1
5.3	10000	2	<i>Capnocytophaga spp</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i>	Bacilo G+ A Bacilo G- A	-	5.3.1 5.3.3
5.4	Ø	0			67,028	
5.5	Ø	0			102,993	
5.6	1200	3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Capnocytophaga spp</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Coco G+ F Bacilo G+ A Bacilo G+ A		5.6.1 5.6.2/5.6.3

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
5.1.2	<i>Propionibacterium acnes</i>
5.1.3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
5.2.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
5.3.3	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
5.6.3	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 6
 Idade: 19 anos
 Dente: 22
 Medicação: CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 6 mm
 Com fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
6.1	96000	2	<i>Lactobacillus lactis lactis</i> <i>Actinomyces viscosus</i>	Bacilo G- F Bacilo G+ F	59,97	6.1.1 6.1.4
6.2	Ø	0			47,003	
6.3	16000	3	<i>Eubacterium faecium</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Actinomyces meyeri</i>	Bacilo G+ F Bacilo G+ F Bacilo G+ F	-	6.3.1/ 6.3.4 6.3.2/6.3.3 6.3.4 6.3.6
6.4	200	1	<i>Propionobacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	53,701	6.4.1
6.5	1000	1	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo G+ F	149,405	6.5.1
6.6	80000	3	<i>Streptococcus sanguis</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Aerococcus viridians</i>	Coco G+ F Coco G+ F Coco G+ F	-	6.6.1 6.6.3 6.6.5

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
6.4.1	<i>Propionobacterium acnes</i>

Caso: 7
 Idade: 33 anos
 Dente: 12
 Medicação: CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 6 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
7.1	44000	5	<i>Prevotella oralis</i> <i>Haemophilus haemolyticus</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Prevotella loeschi</i>	Bacilo G- A Cocobacilo G- A Coco G+ A Bacilo G+ A Bacilo G- A	116,052	7.1.1 7.1.2 7.1.3 7.1.4 7.1.5
7.2	460	1	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo G- A	22,291	7.2.1
7.3	2000	2	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Peptostreptococcus prevotti</i>	Bacilo G- A Coco G+ A	-	7.3.1 7.3.3
7.4	Ø	0			60,465	
7.5	2120	6	<i>Actinomyces israeli</i> <i>Clostridium argentinense</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Peptostreptococcus prevotti</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i>	Bacilo G+ F Bacilo G+ A Bacilo G+ A Coco G+ A Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ F	63,546	7.5.2 7.5.3 7.5.4 7.5.6 7.5.7 7.5.8
7.6	Ø	0			-	

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
7.1.1	<i>Prevotella oralis</i>
7.1.4	<i>Propionibacterium acnes</i>
7.1.5	<i>Prevotella loeschi</i>
7.2.1	<i>Prevotella oralis</i>
7.3.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
7.3.3	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>
7.5.4	<i>Propionibacterium acnes</i>
7.5.6	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>

Caso:8
 Idade: 31 anos
 Dente: 22
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesao: 8 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
8.1	7600	5	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Peptostreptococcus magnus</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo G- A Coco G+ A Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ A Bacilo G+ A	49,95	8.1.1 8.1.2 8.1.3 8.1.5 8.1.6
8.2	160	2	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Peptostreptococcus magnus</i>	Bacilo G- A Coco G+ A	36,69	8.2.1 8.2.2
8.3	44000	1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo G- A	-	8.3.1
8.4	20	1	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	Bacilo G- F	93,616	8.4.1
8.5	20	0	<i>Aerococcus viridans</i> <i>Neysseria</i> spp. <i>Actinomyces meyeri</i>		192,267	
8.6	Ø	0			-	

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
8.1.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
8.1.2	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
8.2.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
8.2.2	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
8.3.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>

caso: 9
 Idade: 33 anos
 Dente: 12
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesão: 8 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
9.1	25000	4	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Clostridium sporogens</i> <i>Gemella morbillorum</i>	Bacilo G- A Bacilo G+ F Bacilo G+ A Coco G+ CO ₂	38,363	9.1.1 9.1.3 9.1.4 9.1.5
9.2	Ø	0			30,768	
9.3	200200	2	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ A	-	9.3.1 9.3.2
9.4	Ø	0			23,488	
9.5	280	3	<i>Veillonella</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Gemella morbillorum</i>	Coco G- A Bacilo G+ F Coco G+ CO ₂	41,509	9.5.1 9.5.2 9.5.3
9.6	20	1	<i>Aerococcus viridians</i>	Coco G+ F	-	9.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test	
Nº congelamento	Microrganismo
9.1.1	<i>Prevotella intermedia</i>
9.3.2	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 10
 Idade: 32 anos
 Dente: 11
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesão: 14 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/ Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
10.1	370000	2	<i>Prevotella oralis</i> <i>Prevotella denticola</i>	Bacilo G- A Bacilo G- A	206,265	10.1.1 10.1.2
10.2	680	1	<i>Prevotella denticola</i>	Bacilo G- A	47,07	10.2.1
10.3	3000	1	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco G+ A	-	10.3.1
10.4	Ø	0			138,086	
10.5	600	1	<i>Actinomyces viscosus</i>	Bacilo G+ F	67,631	10.5.1
10.6	Ø	0			-	

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
10.1.1	<i>Prevotella oralis</i>
10.1.2	<i>Prevotella denticola</i>
10.2.1	<i>Prevotella denticola</i>
10.3.1	<i>Peptostreptococcus micros</i>

Caso: 11
 Idade: 29 anos
 Dente: 12
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesao: 3 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
11.1	60000	2	<i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ F	201,643	11.1.1 11.1.2
11.2	Ø	0			74,462	
11.3	20000	1	<i>Actinomyces viscosus</i>	Bacilo G+ F	-	11.3.1
11.4	Ø	0			97,233	
11.5	Ø	0			221,40	
11.6	6000	3	<i>Clostridium difficile</i> <i>Peptostreptococcus magnus</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A Coco G+ A Bacilo G+ A	-	11.6.1 11.6.2 11.6.3

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
11.6.3	<i>Propionibacterium acnes</i>
11.1.1	<i>Propionibacterium propionicum</i>
11.6.2	<i>Peptostreptococcus magnus</i>

Caso: 12
 Idade: 45 anos
 Dente: 22
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesão: 4 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
12.1	260000	4	<i>Prevotella loeschei</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Prevotella buccae</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G- A Bacilo G- A Bacilo G- A Bacilo G+ A	122,573	12.1.1 12.1.2 12.1.3 12.1.4
12.2	Ø	0			73,0411	
12.3	80	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	-	12.3.1
12.4	Ø	0			174,556	
12.5	Ø	0			21,659	
12.6	40	1	<i>Propionobacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	-	12.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
12.6.1	<i>Propionobacterium acnes</i>
12.1.1	<i>P. loeschei</i>
12.1.2	<i>F. necrophorum</i>
12.1.3	<i>P. buccae</i>
12.1.4	<i>P. acnes</i>

Caso: 13
 Idade: 24 anos
 Dente: 11
 Medicação: CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 3 mm
 Com fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
13.1	30000	1	<i>A. odontolyticus</i>	Bacilo G+ A	171,853	13.1.1
13.2	Ø	0			51,284	
13.3	Ø	0			-	
13.4	Ø	0			69,173	
13.5	900	2	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Clostridium argentinense</i>	Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ A	38,456	13.5.3 13.5.4
13.6	200	1	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>	Coco G+ A	-	13.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
13.6.1	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>

Caso: 14
 Idade: 40 anos
 Dente: 11
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesao: 4 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
14.1	150600	4	<i>Peptostreptococcus prevotti</i> <i>Eubacterilum lentum</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Prevotella intermedia</i>	Coco G+ A Bacilo G+ A Bacilo G- A Bacilo G- A	165,565	14.1.1 14.1.2 14.1.3 14.1.4
14.2	Ø	0			51,284	
14.3	400	2	<i>Peptostreptococcus prevotti</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Coco G+ A Bacilo G+ A	-	14.3.2 14.3.1
14.4	Ø	0			71,762	
14.5		0			57,151	
14.6	4000	1	<i>Aerococcus viridans</i>	Coco G+ F	-	14.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

Nº congelamento	Microrganismo
14.1.1	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>
14.1.3	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
14.1.4	<i>Prevotella intermedia</i>
14.3.2	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>
14.3.1	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 15
 Idade: 35 anos
 Dente: 11
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesão: 2 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
15.1	81000	4	<i>Eubacterilum lentum</i> <i>Veillonella spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Eubacterilum limosum</i>	Bacilo G+ A Coco G- A Bacilo G+ A Bacilo G+ A	144,329	15.1.1 15.1.3 15.1.4 15.1.5
15.2	20	1	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco G+ A	117,48	15.2.1
15.3	3000	1	<i>Eubacterium limosum</i>	Bacilo G+ A	-	15.3.1
15.4	Ø	0			71,762	
15.5		0			57,151	
15.6	20	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	-	15.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
15.2.1	<i>Peptostreptococcus micros</i>
15.6.1	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 16
 Idade: 34 anos
 Dente:12
 Medicação: CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 6 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/ Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
16.1	117000	2	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Actinomyces naeslundii</i>	Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ F	179,568	16.1.1 16.1.2
16.2	240	1	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo G+ F	172,856	16.2.1
16.3	Ø	0			-	
16.4	Ø	0			148,153	
16.5		0			12,57	
16.6	20	1	<i>Streptococcus oralis</i>	Coco G+ F	-	16.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
16.6.1	

Caso: 17
 Idade: 19 anos
 Dente: 44
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesão: 7 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
17.1	1940	4	<i>Eubacterilum lentum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Actinomyces meyeri</i> <i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ A Bacilo G+ F Bacilo G+ F	172,162	17.1.1 17.1.2 17.1.3 17.1.4
17.2	490	4	<i>Eubacterilum lentum</i> <i>Bacteoides spp.</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Clostridium spp.</i>	Bacilo G+ A Bacilo G- A Coco G+ A Bacilo G+ A	85,887	17.2.1 17.2.2 17.2.3
17.3	60000	2	<i>Clostridium spp.</i> <i>Peptostreptococcus prevotti</i>	Bacilo G+ A Coco G+ A	-	17.3.1 17.3.3
17.4	140	3	<i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i>	Coco G+ A Bacilo G+ A Bacilo G+ A	55,483	17.4.1 17.4.2 17.4.3
17.5	360	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	52,894	17.5.1
17.6	200	1	<i>Propionibacterium granulosum</i>	Bacilo G+ A	-	17.6.2

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
17.3.3	<i>Peptostreptococcus micros</i>
17.4.1	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>
17.5.1	<i>Peptostreptococcus micros</i>
17.4.2	<i>Propionibacterium propionicum</i>
17.5.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
17.6.2	<i>Propionibacterium granulosum</i>

Caso: 18
 Idade: 55 anos
 Dente: 31
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesão: 13 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
18.1	552000	7	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Prevotella oralis</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Eubacterium limosum</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Prevotella intermedia</i>	Bacilo G+ F Bacilo G- A Bacilo G+ A Bacilo G+ A Bacilo G+ A Bacilo G- A Bacilo G- A	71,365	18.1.1 18.1.2 18.1.3 18.1.4 18.1.5 18.1.6 18.1.8
18.2	240	3	<i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ F Bacilo G+ A	85,887	18.2.1 18.2.2 18.2.3
18.3	1230000	4	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Peptostreptococcus prevotti</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i>	Bacilo G- A Coco G+ A Bacilo G- A Coco G+ CO ₂	-	18.3.1 18.3.2/18.3.7 18.3.3 18.3.6
18.4	740	2	<i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ A	116,688	18.4.1 18.4.2
18.5	720	3	<i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Capnocytophaga spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	Bacilo G+ A Bacilo G- A Bacilo G+ A	93,333	18.5.1 18.5.2 18.5.3
18.6	4320	2	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Eubacterium limosum.</i>	Coco G+ CO ₂ Bacilo G- A	-	18.6.2 18.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test	
nº congelamento	Microrganismo
18.1.2	<i>Propionibacterium propionicum</i>
18.1.3	<i>Actinomyces naeslundii</i>
18.1.8	<i>Prevotella intermedia</i>
18.3.7	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>
18.2.1	<i>Propionibacterium propionicum</i>
18.3.1	<i>Prevotella intermedia</i>
18.3.3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
18.4.1	<i>Propionibacterium propionicum</i>
18.5.1	<i>Propionibacterium propionicum</i>

Caso: 19
 Idade: 55 anos
 Dente: 41
 Medicação: CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 12
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
19.1	400	2	<i>Clostridium spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ A	124,887	19.1.1 19.1.2
19.2	40	1	<i>Lactobacillus acidophillus</i>	Bacilo G+ F	108,854	19.2.1
19.3	4000	2	<i>Bifidobacterium adolescentis 1</i> <i>Clostridium spp.</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ A	-	19.3.1 19.3.2
19.4	20	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	120,484	19.4.1
19.5	8000	2	<i>Capnocytophaga spp</i> <i>Bifidobacterium spp</i>	Bacilo G- A Bacilo G+ A	177,835	19.5.2
19.6	47200	3	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Trichosporon spp1</i>	Bacilo G+ F Bacilo G+ A Fungo F	-	19.6.1 19.6.2 19.6.3

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
19.4.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
19.6.2	<i>Propionibacterium propionicum</i>

Caso: 20
 Idade: 28 anos
 Dente: 21
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesao: 7
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
20.1	2680000	2	<i>Clostridium spp</i> <i>Capnocytophaga spp</i>	Bacilo G+ A Bacilo G- A	173,608	20.1.1 20.1.3
20.2	140	2	<i>Clostridium paraputrificum</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ A	146,412	
20.3	1130000	3	<i>Capnocytophaga spp</i> <i>Clostridium paraputrificum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilo G- A Bacilo G+ A Bacilo G+ F	-	
20.4	600	1	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Coco G+ CO ₂ Bacilo G+ F	108,922	
20.5	20	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	101,501	20.5.1
20.6	2600	2	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	Bacilo G+ A Bacilo G- A	-	20.6.1 20.6.2

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test	
nº congelamento	Microrganismo
20.2.2	<i>Propionibacterium acnes</i>
20.5.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
20.6.1	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 21
 Idade: 54 anos
 Dente: 43
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesao: 5 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
21.1	2000	1	<i>Capnocytophaga spp</i>	Bacilo G- A	62,08	21.1.1
21.2	20	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	3,88	21.2.1
21.3	40	2	<i>Capnocytophaga spp</i> <i>Bifidobacterium spp</i>	Bacilo G- A Bacilo G+ A	-	21.3.1 21.3.2
21.4	600	1	<i>Capnocytophaga spp</i>		84,187	21.4.1
21.5	Ø	0			7,508	
21.6	52600	3	<i>Gemella morgbilorum</i> <i>Peptostreptococcus prevotti</i> <i>Haemophilus haemolysans</i>	Coco G+ CO ₂ Coco G+ A Bacilo G- A	-	21.6.1 21.6.2 21.6.3

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
21.2.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
21.6.2	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>

Caso: 22
 Idade: 27 anos
 Dente: 11
 Medicação: CHX
 Tamanho da lesão: 14 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
22.1	456666	2	<i>Eubacterium limosum</i> <i>Clostridium bifermentans</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ A	135,351	22.1.1. 21.1.3
22.2	0	0			39,669	
22.3	2000	1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Bacilo G+ A	-	22.3.1
22.4	0				49,237	
22.5	0				56,874	
22.6	20	1	<i>Clostridium spp</i>	Bacilo G+ A	-	22.6.1

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
-	-

Caso: 23
 Idade: 23 anos
 Dente: 12
 Medicação: Ca(OH)₂
 Tamanho da lesão: 14 mm
 Sem fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
23.1	30000	2	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Clostridium spp.</i>	Bacilo G+ F Bacilo G+ A	41,107	23.1.1 23.1.2
23.2	0				22,938	
23.3	0				-	
23.4	0				32,661	
23.5	14		<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Clostridium argentinense</i>	Bacilo G+ F Bacilo G+ A	35,581	23.5.1 23.5.2
23.6	100000		<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Listeria</i> <i>Veillonella spp.</i>	Bacilo G+ F Bacilo G- A Coco G- A	-	23.6.1 23.6.2. 23.6.3

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
23.1.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
23.5.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
23.6.1	<i>Propionibacterium acnes</i>

Caso: 24
 Idade: 37 anos
 Dente: 12
 Medicação: Ca(OH)₂ + CHX gel 2%
 Tamanho da lesão: 6 mm
 Com fístula

Coleta	UFC	nº de microrganismos diferentes encontrados	Identificação	Morfologia/Requerimento gasoso	TESTE LAL EU/mL	código congelamento
24.1	158000	3	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella assacharolitica</i>	Bacilo G+ F Bacilo G- A Bacilo G- A	62,938	24.1.1 24.1.2 24.1.3
24.2	2200	1	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo G+ A	56,29	24.2.1
24.3	2350000	3	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Peptostreptococcus prevotti</i> <i>Peptostreptococcus magnus</i>	Bacilo G+ F Coco G+ A Coco G+ A	-	24.3.1 24.3.2 24.3.3
24.4	300	1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilo G+ F	41,735	24.4.1
24.5	40		<i>Gemella morbillorum</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	Coco G- A Bacilo G+ F	51,888	24.5.1
24.6	100		<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Lactobacillus lactis lactis</i>	Bacilo G+ A Bacilo G+ F	-	24.6.1 24.6.2

F: anaeróbio facultativo; A: anaeróbio; CO₂: CO₂ dependente; G+ : Gram positivo; G-: Gram negativo

E-test

nº congelamento	Microrganismo
24.1.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
24.1.2	<i>Prevotella intermedia</i>
24.1.3	<i>Prevotella assacharolitic</i>
24.2.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
24.3.1	<i>Propionibacterium acnes</i>
24.3.2	<i>Peptostreptococcus prevotti</i>
24.3.3	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
24.6.1	<i>Propionibacterium acnes</i>

ANEXOS

2. CERTIFICADO DO COMITE DE ÉTICA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO
ESPECÍFICO PARA A PESQUISA**

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Ação antimicrobiana de medicamentos locais e sistêmicos sobre microrganismos e endotoxinas isolados de canais radiculares", sob o protocolo nº **111/2002**, da Pesquisadora **Morgana Eli Vianna**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP, em 02/10/2002.

Piracicaba, 27 de fevereiro de 2003

We certify that the research project with title "Atimicrobial activity of local and systemic medicaments against microorganisms and endotoxin isolated from root canal", protocol nº **111/2002**, by Researcher **Morgana Eli Vianna**, responsibility by Prof. Dr. **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas), in 02/10/2002.

Piracicaba, SP, Brazil, February 27 2003


Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Bacteriologia e tratamento de infecções endodônticas - estudo da diversidade e quantidade bacteriana pré e pós-tratamento através de métodos moleculares", protocolo nº 204/2004, dos pesquisadores **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** e **MORGANA ELI VIANNA**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 16/02/2005, e pela CONEP em 07/06/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Bacteriology and treatment of endodontic infections - molecular approach to study the diversity and quantity of bacteria pre- and post endodontic treatment", register number 204/2004, of **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** and **MORGANA ELI VIANNA**, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 16/02/2005, and by CONEP at 07/06/2005.

Cynthia Machado Tabchouy
Cynthia Pereira Machado Tabchouy

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Jacks Jorge Junior
Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO ESPECÍFICO PARA A PESQUISA

TÍTULO: “Ação antimicrobiana de medicamentos locais e sistêmicos sobre microrganismos e endotoxinas isolados de canais radiculares infectados”

O objetivo deste estudo será avaliar a ação antimicrobiana da medicação intracanal, que é utilizada entre sessões, para preencher os espaços dos canais radiculares. Essa medicação, como o próprio nome diz, pode ter efeito medicamentoso, auxiliando no combate da infecção e ativando a mineralização dos tecidos duros, auxiliando no reparo.

Os microrganismos presentes na infecção endodôntica serão isolados, identificados.

Para que servirá a sua participação:

Os resultados obtidos irão auxiliar na terapia endodôntica, ajudando a entender os insucessos, que acontecem mesmo após o emprego de técnicas adequadas. Com esta pesquisa poderemos verificar quais os microrganismos que sobreviveram após o emprego da medicação, verificar se estes oferecem riscos ao sucesso da terapia e ainda a possibilidade de pesquisar em laboratório a ação dessas medicações diretamente sobre os microrganismos.

Como será feito?

A coleta de amostra de bactéria é simples e faz parte do tratamento de canal que já é realizado nesta Faculdade, não existindo outro método alternativo para tal. Ela consiste em colocar uma ponta de papel absorvente estéril dentro do

canal radicular, sendo que esta ponta absorvente já é utilizada rotineiramente no tratamento endodôntico, para secar o canal.

Os procedimentos a serem realizados serão: assepsia durante toda a tratamento de canal e durante a coleta de bactérias; colocação do isolamento absoluto no paciente com a utilização do lençol de borracha; descontaminação do campo operatório; confecção da abertura coronária do dente e, em seguida, a coleta das bactérias com auxílio de gás nitrogênio, para manter as bactérias anaeróbias (bactérias que não vivem na presença de oxigênio do ar) vivas. Esse procedimento será realizado com o uso de um cilindro de gás nitrogênio, ao qual se encontra acoplado uma válvula de segurança, uma mangueira e uma cânula sugadora, formando um dispositivo que direciona o gás somente para a região do dente no qual será realizada a coleta.

Nesta pesquisa, depois de secar o canal, a ponta de papel absorvente será colocada em um meio de cultura líquido (“meio” utilizado para manter as bactérias coletadas vivas), que será posteriormente analisado para verificação do crescimento desses microrganismos.

O procedimento é indolor. Se caso venha sentir dor, esta dor não será por causa da coleta de bactéria e sim, devido à persistência dessa infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais (tecido que está ao redor do dente). Se a dor ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, você poderá ser atendido no Plantão de Urgência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 hs e de 13:30 às 17:30 hs, sendo que o atendimento realizado será o mesmo de rotina do

Plantão, que é tirar a dor. Quanto ao tratamento do dente e a outro tipo de tratamento, você será orientado pelos profissionais do Plantão a procurar a Triagem da Faculdade ou outro tipo de Atendimento Odontológico, como já é feito com todos os pacientes que passam pelo Atendimento do Plantão (somente o alívio da dor e orientação para outro tipo de atendimento).

Pode ocorrer algum risco?

Não terá nenhum risco de vida ou mudança no seu atendimento convencional, já realizado diariamente nesta Faculdade.

O uso da ponta de papel absorvente para secar os canais radiculares faz parte do tratamento de canal de rotina e não traz nenhum risco de vida.

Como já mencionado o procedimento é indolor.

Durante todo o tratamento de canal e coleta de bactéria serão utilizados luvas e óculos de segurança para proteção do operador e do paciente.

Quais são os benefícios?

Os benefícios prestados estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de um tratamento de canal mais eficaz, baseado nos resultados da pesquisa clínica.

O procedimento de coleta de bactéria pode interferir no seu tratamento de canal? Não, o procedimento de coleta bacteriana não irá interferir no tratamento de canal e dessa maneira também não irá interferir no sucesso do tratamento.

Esclarecimentos sobre a pesquisa:

Se participar desta pesquisa, terá toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia (como é feito o trabalho) antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente, com alívio da dor no Plantão de Urgência e orientação para a continuação do tratamento.

Se recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, você não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos (estudo do tipo de bactéria encontrada no canal) serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a sua privacidade quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos nesta pesquisa.

Se participar desta pesquisa não terá nenhum gasto financeiro. Se por acaso, houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento de canal convencional, os gastos com este deslocamento serão ressarcidos. Se por acaso ocorrer algum tipo de dano devido à coleta da amostra microbiológica, você será ressarcido com a reparação ao dano ocorrido durante ou devido a coleta da amostra microbiológica.

Se houver necessidade de consultas extra programadas para a coleta microbiológica, ou seja além das consultas necessárias para o seu tratamento, você receberá o ressarcimento dos gastos.

Qualquer dúvida com relação a pesquisa, poderá nos encontrar através do telefone 4305215 - Departamento de Endodontia, procurar por Profa Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes ou Dra. Morgana Eli Vianna, Av. Limeira, 901 – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP.

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Declaro, com a finalidade de participante, que eu, -----
-----, me disponho a participar da pesquisa intitulada “**Ação antimicrobiana de medicamentos locais e sistêmicos sobre microrganismos e endotoxinas isolados de canais radiculares infectados**” e permito a divulgação dos dados clínicos e microbiológicos obtidos desta pesquisa. Estou ciente dos objetivos desta pesquisa e de todos os procedimentos e concordo com a metodologia para coleta de amostras microbiológicas do(s) dente(s) submetido(s) ao tratamento endodôntico, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP. Estou também ciente de minha liberdade de recusar a participar ou retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem ser penalizado e sem prejuízo ao meu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Assinatura: _____

Local e data:

ANEXOS

3. LISTA DE PUBLICAÇÕES, PROJETOS, CO-ORIENTAÇÕES

Trabalhos completos publicados em periódicos internacionais

1. Gomes B.P.F.A., Vianna, M.E., Sena, N.T., Ferraz, C.C.R., ZAIA, A.A., Souza-Filho, F.J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006: 102: 544-50.
2. Sena NT, Gomes B.P.F.A., Vianna M.E., Berber V.B., ZAIA A.A., FERRAZ C.C.R., Souza-Filho F.J. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single species biofilms. Int Endod J. 2006: 39: 878-85.
3. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J. 2006: 39:484-92.
4. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006: 44:1274-82.
5. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006: 39:10-7.
6. Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. Braz Dent J. 2005: 16:175-80.
7. Horz HP, Vianna ME, Gomes BP, Conrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. J Clin Microbiol. 2005: 43:5332-7.
8. Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi Vde P, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and

- sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005: 100:512-7.
9. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005: 20:253-8.
 10. Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Braz Dent J.* 2004: 1: 30-5.
 11. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004: 97:79-84.
 12. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J.* 2002: 3:155-61.
 13. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001: 34:424-8.
 14. Vianna M.E., Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Zilio C.C.R., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. pH evaluation of several calcium hydroxide pastes at different periods of time. *Brazilian Dental Journal*, *in press*.
 15. Vianna ME, Gomes BP, Conrads G, Horz HP. Quantification and characterization of *Synergistes* in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* *in press*.

Resumos publicados em periódicos internacionais

1. Vianna, M.E.; Horz, H.P.; Gomes, B.P.F.A.; Conrads, G. Microarrays to support identification of bacteria involved in endodontic infections. *Anaerobe*. 2005, 11: 32.
2. Conrads, G.; Vianna, M.E.; Horz, H.P.; Gomes, B.P.F.A.; Microarrays to support identification of bacteria involved in endodontic infections. *Anaerobe*. 2005, 11: 39.
3. Horz, H.P.; Vianna, M.E.; Gomes, B.P.F.A.; Conrads, G. Microarrays to support identification of bacteria involved in endodontic infections. *International Journal of Medical Microbiology*. 2004, 294: 188.
4. Sena, N.T.; Gomes, B.P.F.A.; Vianna, M.E.; Berber, V.B.; Ferraz, C.C.R. In vitro evaluation of the antibacterial action of Ca(OH)₂, 2% chlorhexidine gluconate and association of both. *Journal of Dental Research*. 2003, 82: 138.
5. Signoretti, F.G.C.; Gomes, B.P.F.A.; Pedroso, J.A.; Teixeira, F.; Vianna, M.E.; Jacinto, R.C.; Ferraz, C.C.R. An in vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Journal of Dental Research*. 2003, 153.
6. Zilio, D.M.; Vianna, M.E.; Ferraz, C.C.R.; Gomes, B.P.F.A.; Teixeira, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. Influence of several vehicles on the pH of clachim hydroxide pastes. *Journal of Dental Research*. 2003, 174.
7. Vianna, M.E.; Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; Teixeira, F.B.; Zaia, A.A.; Souza-Filho, F.J. Susceptibility of microorganisms isolated from root canals to calcium hydroxide in combination with several vehicles. *Journal of Dental Research*. 2003, 82: 196.
8. Vianna, M.E.; Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; Berber, V.B.; Souza-Filho, F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine. *Journal of Dental Research*. 2002, 81: B151.
9. Vianna, M.E.; Gomes, B.P.F.A.; Berber, V.B.; Ferraz, C.C.R.; Souza-Filho, F.J. In vitro antimicrobial activity of chlorhexidine gel. *Journal of Dental Research*. 2001, 80: 1090

10. Berber, V.B.; Gomes, B.P.F.A.; Vianna, M.E.; Teixeira, F.B.; Souza, F.J. In vitro investigation of the susceptibility of microorganisms to chlorhexidine liquid. 2001, 80: 1090.

Projetos de pesquisa

1. Vianna M.E. Atividade antimicrobiana de algumas substâncias utilizadas como irrigantes endodônticos e medicação intracanal, UNICAMP., F.O. 2002., 383 p. tese de Mestrado.

Orientação: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, 03/2001-12/2002.

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

2. Bacteriology and treatment of endodontic infections – molecular approach to study the diversity and quantity of bacteria pre- and post endodontic treatment.

Orientação: Georg Conrads, 03/2005- 02/2006.

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

3. Charakterisierung methanogener und sulfatreduzierender Archaea anhand ihrer funktionellen Gene mcrA sowie dsrAB im Modellsystem Mundhöhle – Pilotstudie zur medizinischen Relevanz der Urbakterien.

Orientação: Hans-Peter Horz

Apoio: START Projekt RWTH Aachen – University Hospital

4. Antimicrobial effects of instrumentation and irrigation on infection in pulpless teeth with periapical lesions.

Orientação: Georg Conrads, 11/2003- 04/2004.

Apoio: Programme AlBan (European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America)

5. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas

Orientação: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, desde 03/2003.

Apoio: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (03/2003 – 10/2003, 05/2004 – 02/2005, 03/2006).

Co-orientações de iniciação científica

1. Frederico Marques Lima dos Santos. Avaliação *in vitro* de diferentes protocolos de descontaminação da coroa dental e câmara pulpar, antes do tratamento endodôntico e da coleta de microrganismos do canal radicular. 2003. 0 f. Iniciação Científica. (Graduando em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
2. Pollyana Maia Ferreira. Variações na susceptibilidade dos componentes da microbiota endodôntica aos medicamentos intracanaís. 2003. 0 f. Iniciação Científica. (Graduando em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
3. Danila Molina Zilio. Avaliação da alteração do pH da pasta de hidróxido de cácio em veículo aquoso, clorexidina gel e da associação de ambos em função do tempo e da presença de dentina. 2002. 0 f. Iniciação Científica. (Graduando em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Caio Cezar Randi Ferraz.
4. Vanessa Bellochio Berber. Atividade antimicrobiana dos irrigantes usados em endodontia.. 2001. 0 f. Iniciação Científica. (Graduando em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

ANEXOS

4. RESUMOS DE PUBLICAÇÕES COMPLETAS SOBRE MICROBIOLOGIA E TERAPIA ENDODÔNTICA (2003-2006)

4.1. MICROBIOLOGIA DOS CANAIS RADICULARES

Vianna M.E., Conrads G., Gomes B.P., Horz H.P. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006: 44:1274-82.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2005: 20:253-8.

Vianna ME, Gomes BP, Conrads G, Horz HP. Quantification and characterization of *Synergistes* in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. *in press*

-

Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1274-82

Members of the domain Archaea, one of the three domains of life, are a highly diverse group of prokaryotes, distinct from bacteria and eukaryotes. Despite their abundance and ubiquity on earth, including their close association with humans, animals, and plants, so far no pathogenic archaea have been described. As some archaea live in close proximity to anaerobic bacteria, for instance, in the human gut system and in periodontal pockets, the aim of our study was to assess whether archaea might possibly be involved in human endodontic infections, which are commonly polymicrobial. We analyzed 20 necrotic uniradicular teeth with radiographic evidence of apical periodontitis and with no previous endodontic treatment. Using real-time quantitative PCR based on the functional gene *mcrA* (encoding the methyl coenzyme M reductase, specific to methanogenic archaea) and on archaeal 16S rRNA genes, we found five cases to be positive. Direct sequencing of PCR products from both genes showed that the archaeal community was dominated by a *Methanobrevibacter oralis*-like phylotype. The size of the archaeal population at the diseased sites ranged from 1.3×10^5 to 6.8×10^5 16S rRNA gene target molecule numbers and accounted for up to 2.5% of the total prokaryotic community (i.e., bacteria plus archaea). Our findings show that archaea can be intimately connected with infectious diseases and thus support the hypothesis that members of the domain Archaea may have a role as human pathogens.

PMID: 16597851 [PubMed - in process]

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2005 Aug;20(4):253-8.

The aim of this study was to investigate the microbial composition of necrotic root canals using culture methods and microarray technology. Twenty uniradicular teeth with radiographic evidence of periapical bone loss and with no previous endodontic treatment were selected for this study. For molecular diagnosis a DNA chip with 20 different species-specific, 16S-rDNA-directed catcher probes was used. The microorganisms most frequently detected by the DNA chip were: *Micromonas micros*, *Fusobacterium nucleatum* ssp., *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Veillonella parvula*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus*, and *Streptococcus constellatus*. As expected, additional important bacterial taxa were found by culture analysis, but microorganisms such as *T. forsythia* and *T. denticola* could not be identified. In conclusion, microarrays may provide significant additional information regarding the endodontic microbiota by detecting bacterial species that are otherwise difficult or impossible to culture.

PMID: 15943771 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Vianna ME, Gomes BPFA, Conrads G, Horz HP. Quantification and characterization of *Synergistes* in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. *In press*

Bacterial species belonging to the *Synergistes* group have been recently reported to be involved in human endodontic infections, and therefore may participate in the etiology of the perirradicular diseases. The prime objective of this study was to identify and quantify the species from the *Synergistes* group and also compare their prevalence and abundance to the microbial community of species *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*, genus *Treponema*, and total bacteria present in the root canals containing necrotic pulp tissue. We analyzed third-two necrotic uniradicular teeth with radiographic evidence of apical periodontitis and with no previous endodontic treatment. All teeth investigated were asymptomatic and without periodontal disease. By use of real-time quantitative PCR based on specific primers for *Synergistes*-group, 21.87% of the cases were positive. The size of the *Synergistes* population ranged from 1.5×10^3 to 5.0×10^4 16S rRNA gene targeted molecule numbers, and accounted 0.03% of the total bacteria community. *Prevotella intermedia* was present in 15.63% of the infected root canals, while *Porphyromonas gingivalis* in 28.12%, and *Treponema* sp. in 56.25%. Their population of the total bacteria community corresponded to <0.1%, 0.2% and 0.35% respectively. The prevalence and quantity of *Synergistes* are in the range of the endodontopathogens, therefore they may participate from the etiology of the perirradicular diseases in the primary endodontic infections.

4.2. **REDUÇÃO MICROBIANA**

Horz HP, **Vianna ME**, Gomes BP, Conrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. J Clin Microbiol. 2005: 43:5332-7.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J. 2006: 39:484-92.

Horz HP, Vianna ME, Gomes BP, Contrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5332-7.

Division of Oral Microbiology and Immunology, Department of Operative and Preventive Dentistry & Peridontology, RWTH Aachen University Hospital, Aachen, Germany.

By re-examining 10 previously published "universal" PCR assays using the ARB phylogenetic software package and database with 41,000 16S rRNA gene sequences, we found that they differed considerably in their coverage of the domain Bacteria. We evaluated the broadest-range real-time quantitative PCR protocol for its efficacy in measuring the antimicrobial effects of endodontic treatments.

PMID: 16208011 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue Int Endod J. 2006 Jun;39(6):484-92.

AIM: To determine in vivo, the degree of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue when using two endodontic irrigating reagents, sodium hypochlorite (NaOCl) or chlorhexidine gel (CHX). METHODOLOGY: Thirty-two single rooted teeth with necrotic pulp were divided into two groups. One group (n=16) was irrigated with 2.5% NaOCl, whilst the other group (n=16) was irrigated with 2% CHX gel. Assessment of the bacterial load was accomplished by use of real-time quantitative-polymerase chain reaction (RTQ-PCR) directed against the small subunit ribosomal DNA using the SYBRGreen and TaqMan formats. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. For contrast, bacterial load was also determined by traditional culture techniques. RESULTS: The bacterial load was reduced substantially in both groups (over 96%). However, using RTQ-PCR the bacterial load before and after chemo-mechanical preparation was greater when compared with evaluation using colony forming units (CFU). Furthermore, as measured by RTQ-PCR, the bacterial reduction in the NaOCl-group (SYBRGreen 99.99%; TaqMan: 99.63%) was significantly greater ($P<0.01$) than in the CHX-group (SYBRGreen 96.62%; TaqMan: 96.60%). According to culture technique 75% of cases were free of bacteria after chemo-mechanical preparation in the NaOCl-group, whilst 50% of cases were bacteria free in the CHX-group. CONCLUSION: NaOCl has not only a higher capacity to kill microorganisms but is also more able to remove cells from the root canal.

PMID: 16674744 [PubMed - indexed for MEDLINE]

4.3 SOLUÇÕES IRRIGADORAS

Sena NT, Gomes B.P.F.A., Vianna M.E., Berber V.B., Zaia A.A., Ferraz C.C.R., Souza-Filho F.J. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single species biofilms. Int Endod J.,. 2006: 39: 878-85.

Berber V.B., Gomes B.P.F.A., Sena N.T., **Vianna M.E.**, Ferraz C.C., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006: 39:10-7.

Vianna M.E., Gomes B.P.F.A., Berber V.B., Zaia A.A., Ferraz C.R., de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004: 97: 79-84.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J. 2006 Nov;39(11):878-85.

AIM: To investigate the antimicrobial activity of 2.5% and 5.25% sodium hypochlorite and 2.0% chlorhexidine gel and liquid as endodontic-irrigating substances against selected single-species biofilms. **METHODS:** Single-species biofilms of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Fusobacterium nucleatum* were generated on a cellulose nitrate membrane placed on agar medium. The biofilms were then immersed in the endodontic-irrigating substances for 30 s and also for 5, 10, 15, 30 and 60 min, with and without mechanical agitation. Sterile saline was used as control. After each time period, the membrane filters were then transferred to tubes containing 2 mL of fresh broth medium plus neutralizers (in order to prevent the residual action of the tested substances). The micro-organisms were suspended using a vortex, and the inoculum was serially diluted 10-fold. Aliquots of the dilutions were plated on 5% sheep blood agar medium, and incubated under adequate gaseous conditions. Colony-forming units were calculated. The samples were compared using the Friedman and Tukey test, when necessary, at a significance level of $P < 0.05$. **RESULTS:** Mechanical agitation promoted the effectiveness of the antimicrobial agents, resulting in less time to eliminate the same micro-organisms, except for *S. aureus* with 2.5% NaOCl. Antimicrobial agents in liquid presentation, especially 5.25% NaOCl and 2% chlorhexidine, killed the tested micro-organisms more rapidly. Saline did not inhibit the growth of any of the tested micro-organisms, with or without agitation, being statistically different ($P < 0.05$) from NaOCl and chlorhexidine. *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* and *F. nucleatum* were eliminated in 30 s by all antimicrobial agents, with or without agitation, in contrast with the facultative and aerobe strains. **CONCLUSIONS:** Mechanical agitation

improved the antimicrobial properties of the chemical substances tested using a biofilm model, favouring the agents in liquid presentation, especially 5.25% NaOCl and 2% chlorhexidine.

-

PMID: 17014526 [PubMed - in process]

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006 Jan;39(1):10-7.

AIM: To evaluate the efficacy of 0.5%, 2.5% and 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) as intracanal irrigants associated with hand and rotary instrumentation techniques against *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **METHODOLOGY:** A total of 180 extracted human premolar teeth were infected for 21 days with *E. faecalis*. The specimens were divided into 12 groups, as follows: group 1: 5.25% NaOCl + Hybrid technique (Valdrighi et al. 1998); group 2: 5.25% NaOCl + nickel-titanium (NiTi) rotary technique 4 mm shorter than the apex (by FOP-UNICAMP); group 3: 5, 25% NaOCl + NiTi rotary technique (Hero 642); group 4: 2.5% NaOCl + Hybrid technique; group 5: 2.5% NaOCl + NiTi rotary technique 4 mm shorter than the apex; group 6: 2.5% NaOCl + NiTi rotary technique (Hero 642); group 7: 0.5% NaOCl + Hybrid technique; group 8: 0.5% NaOCl + NiTi rotary technique 4 mm shorter than the apex; group 9: 0.5% NaOCl + NiTi rotary technique (Hero 642); group 10: sterile saline solution + Hybrid technique; group 11: sterile saline solution + NiTi rotary technique 4 mm shorter than the apex; group 12: sterile saline solution + NiTi rotary technique (Hero 642). Canals were sampled before and after preparation. After serial dilution, samples were plated onto brain heart infusion (BHI) agar, and the colony forming units (CFU) that were grown were counted. The teeth were sectioned into three thirds and dentine chips were removed from the canals with conical burs. The samples obtained with each bur were immediately collected into test tubes containing BHI broth, and were incubated at 37 degrees C and plated onto BHI agar. The CFU were counted and analysed. **RESULTS:** At all depths and thirds of the root canals and for all techniques used, 5.25% NaOCl was shown to be the most effective irrigant solution tested when dentinal tubules were analysed, followed by 2.5% NaOCl. No differences among concentrations in cleaning the canals were found.

CONCLUSIONS: Especially at higher concentrations, NaOCl, was able to disinfect the dentinal tubules, independent of the canal preparation technique used.

PMID: 16409323 [PubMed - indexed for MEDLINE]

-
-

Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Jan;97(1):79-84.

The aim of this study was to investigate in vitro the antimicrobial activity of 0.2%, 1%, and 2% chlorhexidine gluconate (CHX gel and CHX liquid), against endodontic pathogens and compare the results with the ones achieved by 0.5%, 1%, 2.5%, 4%, and 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl). A broth dilution test was performed, and the timing for irrigants to kill microbial cells was recorded and statistically analyzed. Both 2.0% gel and liquid formulations eliminated *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in 15 seconds, whereas the gel formulation killed *Enterococcus faecalis* in 1 minute. All tested irrigants eliminated *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in 15 seconds. The timing required for 1.0% and 2.0% CHX liquid to eliminate all microorganisms was the same required for 5.25% NaOCl. The antimicrobial action is related to type, concentration, and presentation form of the irrigants as well as the microbial susceptibility.

PMID: 14716261 [PubMed - indexed for MEDLINE]

4.4. MEDICAMENTOS INTRACANAIS

Vianna M.E., Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Zilio C.C.R., Zaia A.A., Souza-Filho F.J. pH evaluation of several calcium hydroxide pastes at different periods of time. Braz Dent J. in press

Gomes B.P.F.A., **Vianna M.E.**, Sena N.T., Zaia A.A., Ferraz C.C.R., Souza-Filho F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. in press.

Vianna ME, Gomes B.P., Sena N.T., Zaia A.A., Ferraz C.R., Souza Filho F.J. In vitro evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. Braz Dent J. 2005: 16:175-80.

Vianna ME, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zilio DM, Zaia AA, Souza-Filho FJ. pH evaluation of several calcium hydroxide pastes at different periods of time. Braz Dent J. *in press*

The purpose of this *in vitro* study was to measure the pH of calcium hydroxide $[(\text{Ca}(\text{OH})_2)]$ pastes combined to different vehicles in seven periods of time. The $\text{Ca}(\text{OH})_2$ were manipulated with the vehicles: (i) sterile water; (ii) glycerin; (iii) camphorated paramonochlorophenol (CMCP) + glycerin; (iv) CMCP; (v) local anesthetics (Lidocaine 2% with 1: 100.000 epinephrine; (vi) iodoform plus sterile water; (vii) polyethyleneglycol; (viii) polyethyleneglycol plus CMCP; and (ix) 2.0% chlorhexidine gel. The pastes were made in glass plate at tooth pastes consistency and measured in the periods: 5 min, 1, 24, 48 h, 7, 14 and 28 days. The data were statistically analyzed (Kruskal-Wallis at $p < 0.05$). At 5 min, 1 and 24 h the pH of all tested pastes ranged from 13.05 to 11.16. At 48 and 7 days the pH of all tested pastes ranged from 11.66 to 8.92. At 14 and 28 almost all pastes showed the pH means lower than 10. In conclusion, the pH means of all tested calcium hydroxide pastes decreased according to time.

-

Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Oct;102(4):544-50. Epub 2006 Aug 4.

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of calcium hydroxide (Ca(OH)₂) combined with 2% chlorhexidine gluconate (CHX) gel against endodontic pathogens and to compare the results with the ones achieved by Ca(OH)₂ mixed with sterile water and by CHX gel alone. Two methods were used: the agar diffusion test and the direct contact test. Ca(OH)₂ + 2% CHX gel produced inhibitory zones ranging from 2.84 to 6.5 mm, and required from 30 seconds to 6 hours to eliminate all tested microorganisms. However, 2% CHX gel showed the largest microbial growth zones from 4.33 to 21.67 mm, and required 1 minute or less to inhibit all tested microorganisms. A paste of Ca(OH)₂ plus sterile water inhibited only the microorganisms with which it was in direct contact and required from 30 seconds to 24 hours to kill all tested microorganisms. In conclusion, 2% CHX gel + Ca(OH)₂ showed better antimicrobial activity than Ca(OH)₂ manipulated with sterile water.

PMID: 16997123 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. Braz Dent J. 2005;16(3):175-80. Epub 2006 Jan 12

The aim of this study was to investigate in vitro the antimicrobial activity of calcium hydroxide [Ca(OH)₂] in combination with different vehicles against endodontic pathogens. For such purpose, a broth dilution test was performed. Pastes were prepared with Ca(OH)₂ powder and the following vehicles: sterile water, glycerin, camphorated monochlorophenol (CMCP), CMCP + glycerin, polyethyleneglycol and CMCP + polyethyleneglycol. The time required for the pastes to produce negative cultures against the tested microorganisms was recorded and analyzed statistically using the Kruskal Wallis test at 5% significance level. Timing for pastes to eliminate the aerobic and facultative anaerobic microorganisms ranged from 6 to 24 h, while strict anaerobic microorganisms were inhibited within 30 s to 5 min. Microbial susceptibility, ranked from weakest to strongest, can be presented as follows: *Enterococcus faecalis* (the most resistant microorganism), *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia* (the last two microorganisms required the same time to be eliminated). In conclusion, calcium hydroxide pastes needed more time to eliminate facultative than anaerobic microorganisms. These findings suggest that the antimicrobial property is related both to paste formulation and to microbial susceptibility.

PMID: 16429180 [PubMed - in process]

4.5. MATERIAIS OBTURADORES

Gomes BP, **Vianna ME**, Matsumoto CU, Rossi V de P, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 100:512-7.

Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC, **Vianna ME**, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. Braz Dent J. 2004; 1: 30-5.

Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi Vde P, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 Oct;100(4):512-7.

OBJECTIVES: To evaluate the effectiveness of chlorhexidine (CHX) or sodium hypochlorite (NaOCl) in disinfecting gutta-percha cones, to verify contamination of gutta-percha cones in their boxes, and to identify microorganisms after intentional contamination by handling cones. **STUDY DESIGN:** Gutta-percha cones contaminated in vitro with several microorganisms were left in contact with tested disinfecting solutions for different times, sterility of storage boxes was evaluated by immersing cones in broth medium, and the microorganisms most frequently found in handling cones were identified using biochemical tests. **RESULTS:** CHX was not effective in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones after 72 h of contact with the disinfecting substance. 5.25% NaOCl eliminated spores from gutta-percha after 1 min of disinfection. The cones evaluated from their boxes did not show contamination in 94.5% of the cases. The microbial genus most frequently found after intentional contamination with gloves was *Staphylococcus*. **CONCLUSION:** 5.25% NaOCl is an effective agent for a rapid disinfection of gutta-percha cones.

PMID: 16182174 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. Braz Dent J. 2004;15(1):30-5. Epub 2004 Aug 16

The aim of the present study was to analyze the antimicrobial properties of five endodontic sealers: Endo Fill, Endomethasone, Endomethasone N, Sealer 26 and AH-Plus, against the following microorganisms: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces naeslundii*. The sealers were tested immediately, 24 h, 48 h and 7 days after manipulation. The direct contact method through the observation of the microbial growth in liquid medium and the agar diffusion test were used to evaluate the antimicrobial properties of the sealers. The results, in both methodologies used, showed that immediately after manipulation, Endo-Fill and Endomethasone demonstrated the highest antimicrobial activity, with no statistically significant difference between them. Sealer 26 demonstrated the lowest antimicrobial activity. At all other times after manipulation, there were no statistically significant differences among all the sealers tested. In conclusion, none of the sealers totally inhibited the growth of the microorganisms. Furthermore, the antimicrobial activity of each sealer decreased with time and was dependent upon the microbial susceptibility to them.

PMID: 15322642 [PubMed - in process]